

**Untersuchungen zu neuroanatomischen Veränderungen beim
Gesangslernen des Zebrafinken *Taeniopygia guttata***

D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung des akademischen Grades
d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m
(Dr. rer. nat.)
im Fach Biologie

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin
von
Dipl. Biol. Viola von Bohlen und Halbach
(geboren am 18.06.1970 in Heidelberg)

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Jürgen Mlynek
Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Thomas Buckhout, PhD

Gutachter / innen: 1. PD Dr. B. E. Nixdorf-Bergweiler
2. Prof. Dr. C. Scharff
3. Prof. Dr. K. Unsicker

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Juli 2005

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AFP	„anterior forebrain pathway“ (anteriore Vorderhirnschleife)
BOS	„bird own song“ (der eigene Gesang des Vogels)
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cm	Zentimeter
DAT	„digital audio tape“
DLM	Nucleus dorsolateralis medialis des anterioren Thalamus
DM	Dorsomedialer Teil des Nucleus intercollicularis
DMP	posteriorer Anteil des dorsomedialen Nucleus des Thalamus
f	Frequenz
FDA	Fluorescein-Dextranamin
g	Gramm
GLM	„general linear model“
Hz	Hertz
LaM:	Lamina mesopallialis (früher: LH: Lamina Hyperstriatica)
LMAN	Nucleus lateralis magnocellularis nidopallii anterioris (früher: Nucleus lateralis magnocellularis neostriatali anterioris)
LPS:	Lamina pallio-subpallialis (früher: LMD: Lamina medullaris dorsalis)
LTP	„long term potentiation“ (Langzeitpotenzierung)
ml	Milliliter
MMAN	Nucleus medialis magnocellularis nidopallii anterioris (früher: Nucleus medialis magnocellularis neostriatali anterioris)
ms	Millisekunde
M. soz.	sozial aufgezogene Männchen
MW	Mittelwert
M. depr.	gesangsdepriviert aufgezogene Männchen
µm	Mikrometer
µM	mikromolar

N	Anzahl der untersuchten Tiere
n	Anzahl der Injektionen pro Gehirnareal innerhalb einer Gruppe
nAM	Nucleus ambiguus
Nlf	Nucleus interfaccialis nidopallii
nRAm	Nucleus retroambigualis
ns	nicht signifikant
Ov	Nucleus ovoidalis
PFA	Paraformaldehyd
RA	Nucleus robustus arcopallii (früher: Nucleus robustus archistriatalis)
RDA	Rhodamin-Dextranamin
nXII	Nucleus nervi hypoglossi
STD	Standardabweichung
STD-F	Standardfehler
StM	Striatum mediale (früher: LPO: Lobus parolfactorius)
Tab.	Tabelle
t	Zeit
Uva	Nucleus uvaeformis
W. soz.	sozial aufgezogene Weibchen
W. depr.	gesangsdepriviert aufgezogene Weibchen
%	Prozent

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	4
ZUSAMMENFASSUNG	7
1. EINLEITUNG	9
1.1. Gesangslernen bei Zebrafinken	11
1.2. Struktur des Gesangs bei Zebrafinken	12
1.3. Gesangsentwicklung bei Zebrafinken	14
1.4. Das neuronale Gesangssystem	14
1.4.1. Kerngebiete des Gesangssystems	15
1.4.1.1. HVC	16
1.4.1.2. Area-X	17
1.4.1.3. Nucleus dorsolateralis medialis des anterioren Thalamus (DLM)	18
1.4.1.4. Nucleus lateralis magnocellularis nidopallii anterioris (LMAN)	18
1.4.1.5. Nucleus robustus arcopallii (RA)	20
1.4.1.6. Nucleus nervi hypoglossi (nXII)	22
1.4.1.7. Überblick zur Lokalisation und Funktion der vorgestellten Gesangsareale	22
1.4.2. Konnektivitäten innerhalb des Gesangssystems	23
1.4.2.1. Die „prämotorische Bahn“	23
1.4.2.2. Die „anteriore Vorderhirnschleife“	24
1.5. Morphologische Korrelate neuronaler Plastizität	26
1.5.1. Sexualdimorphismus	26
1.5.2. Auswirkungen von Deprivationen	29
1.6. Ziel der Arbeit	33
2. MATERIAL UND METHODEN	35
2.1. Versuchstiere	35
2.1.1. Systematik	35
2.1.2. Herkunft, Aufzucht, Haltung	35
2.2. Gesangsaufnahmen und Sonagramme	36

2.2.1. Lautäußerungen sozial und gesangsdepriviert aufgezogener Tiere	36
2.3. Methoden der Fasermarkierungsstudie	39
2.3.1. Anfertigung von Gefrierschnitten	40
2.3.2. Auswertung und Dokumentation der Fluoreszenzpräparate	42
2.4. Methoden der morphometrischen Studie	42
2.4.1. Betäubung, Perfusion und Gehirnentnahme	42
2.4.2. Anfertigung von Vibratomschnitten	43
2.4.2.1. Volumenbestimmung	43
2.4.3. Anfertigung von Semidünnschnitten	44
2.4.3.1. Bestimmung der Soma- und Nukleusanschnittsflächen	47
2.4.3.2. Bestimmung der Neuronendichte und der Neuronenanzahl	48
2.4.4. Auswertung der morphometrischen Studien	50
3. ERGEBNISSE	52
3.1. Fasermarkierungsstudie	52
3.1.1. „Tracer“-Applikationen bei Zebrafinkenmännchen	52
3.1.2. „Tracer“-Applikationen bei Zebrafinkenweibchen	55
3.1.2.1. „Tracer“-Applikationen bei sozial aufgezogenen Weibchen	55
3.1.2.2. „Tracer“-Applikationen bei gesangsdepriviert aufgezogenen Weibchen	58
3.1.3. Zusammenfassung der Ergebnisse der Fasermarkierungsstudie	61
3.2. Morphometrische Studie	62
3.2.1. HVC	62
3.2.1.1. Folgen gesangsdeprivierter Aufzucht im HVC	62
3.2.1.2. Geschlechtsspezifische Untersuchungen im HVC	67
3.2.2. Area-X	69
3.2.2.1. Folgen gesangsdeprivierter Aufzucht auf die Area-X	69
3.2.3. Nucleus dorsolateralis medialis des anterioren Thalamus (DLM)	71
3.2.3.1. Folgen gesangsdeprivierter Aufzucht im DLM	71
3.2.4. Nucleus lateralis magnocellularis nidopallii anterioris (LMAN)	74
3.2.4.1. Folgen gesangsdeprivierter Aufzucht im LMAN	74
3.2.4.2. Geschlechtsspezifische Untersuchungen im LMAN	77
3.2.5. Nucleus robustus arcopallii (RA)	81

3.2.5.1. Folgen gesangsdeprivierter Aufzucht im RA.....	81
3.2.5.2. Geschlechtsspezifische Untersuchungen im RA	86
3.2.6. Zusammenfassung der Ergebnisse der morphometrischen Studie	88
3.2.6.1. Folgen gesangsdeprivierter Aufzucht	89
3.2.6.2. Geschlechtsspezifische Unterschiede	91
4. DISKUSSION	94
4.1. Methodendiskussion	95
4.2. Geschlechtsspezifische Unterschiede und Übereinstimmungen.....	97
4.2.1. Konnektivitäten des Gesangssystems.....	97
4.2.2. Morphologie der Gesangsareale	100
4.3. Auswirkungen gesangsdeprivierter Aufzucht	109
4.4. Schlussbetrachtung	114
5. LITERATURVERZEICHNIS	117
6. ANHANG.....	137
6.1. Rezepturen	137
6.2. Veröffentlichungsnachweis	141
6.3. Erklärung	143

ZUSAMMENFASSUNG

Der Gesangserwerb bei Singvögeln ist ein etabliertes Modell zur Erforschung von Lern- und Gedächtnisprozessen. Für die Kontrolle des Gesangsverhaltens von Singvögeln ist ein neuronales Netzwerk verantwortlich, das als Gesangssystem bezeichnet wird. Innerhalb dieses Gesangssystems unterscheidet man zwei Hauptstränge: eine prämotorische Bahn, die für die Steuerung des Gesangs verantwortlich ist, und eine anteriore Vorderhirnschleife („anterior forebrain pathway“; AFP), die mit der Niederlegung eines Gesangsmusters im Gedächtnis und mit dem Abgleich des gehörten Gesangs an dieses Gesangsmuster in Zusammenhang gebracht wird. Bei Zebrafinken (*Taeniopygia guttata*) lernen nur die Männchen singen, während Weibchen lediglich angeborene Kontaktrufe äußern. Gemeinsam ist beiden Geschlechtern jedoch, dass sie arteigenen Gesang, den sie von einem Tutor hören, in Form eines Gesangsmusters im Gedächtnis speichern.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe von fluoreszenten Markern, die *in vivo* in einzelne Gesangsareale der AFP injiziert wurden, gezeigt, dass die Konnektivitäten innerhalb der AFP in beiden Geschlechtern ähnlich verlaufen. Auf diesen Ergebnissen aufbauend wurden die Gesangsareale der AFP adulter Zebrafinken vergleichend zwischen den Geschlechtern bezüglich ihrer Volumenausbildung untersucht und die Anzahl, Dichte und Größe der Neurone und deren Zellkerne innerhalb dieser Gesangsareale bestimmt. Im Gesangsareal HVC waren alle diese Parameter und im *Nucleus robustus arcopallii* (RA) alle außer der Neuronendichte bei Männchen signifikant größer als bei Weibchen. Das Gesangsareal *Nucleus lateralis magnocellularis nidopallii anterioris* (LMAN) war bei Männchen und Weibchen gleich groß ausgebildet. Alle anderen untersuchten Parameter verhielten sich in diesem Gesangsareal sexualdimorph. So waren die Größe der Neurone und deren Nuklei bei Weibchen signifikant kleiner als bei Männchen, während die Neuronendichte und -anzahl im LMAN bei Weibchen größer war als bei Männchen.

Des Weiteren wurden adulte Zebrafinken auf Folgen gesangsdeprivierter Aufzucht untersucht, denn morphologische Unterschiede zwischen sozial und gesangsdepriviert aufgezogenen Tieren könnten Hinweise auf Ort und Art der Speicherung des erlernten Gesangsmusters geben. Auch bei diesem Untersuchungsansatz wurden die Gesangsareale der AFP nach den oben genannten Parametern untersucht. Bei den Männchen wurden Folgen gesangsdeprivierter Aufzucht in den Gesangsarealen HVC,

Nucleus dorsolateralis medialis des anterioren Thalamus (DLM) und RA ermittelt. Das HVC-Volumen gesangsdepriviert aufgezogener Männchen war kleiner ausgebildet als bei sozial aufgezogenen Tieren, während das DLM-Volumen gesangsdepriviert aufgezogener Männchen größer als bei sozial aufgezogenen Männchen war. Im RA hingegen unterschieden sich die gesangsdepriviert aufgezogenen Männchen durch eine höhere Neuronendichte von sozial aufgezogenen Männchen.

Bei Zebrafinkenweibchen wurden die der AFP zugehörigen Projektionen vom DLM zum LMAN und vom LMAN zum RA erstmals auch in gesangsdepriviert aufgezogenen Tieren nachgewiesen. Weiterführende morphometrische Untersuchungen der Gesangsareale HVC, DLM, LMAN und RA von Weibchen zeigten ausschließlich im Gesangsareal RA Veränderungen nach gesangsdeprivierter Aufzucht. In dieser Region war sowohl das Areal-Volumen als auch die Größe der darin enthaltenen Neurone bei gesangsdepriviert aufgezogenen Weibchen kleiner als bei sozial aufgezogenen Weibchen. Dies lässt vermuten, dass insbesondere dem RA eine spezifische Funktion beim Erlernen der Erkennung des arteigenen Gesangsmusters zuteil wird, da dieser Prozess sowohl bei Männchen als auch bei Weibchen stattfindet.

1. EINLEITUNG

Zu den herausragenden Leistungen der Gehirne höherer Vertebraten zählt ihre Lernfähigkeit. Diese Lernprozesse lassen sich mit deutlichen neuroanatomischen Veränderungen der Hirnstruktur korrelieren (Changeux and Danchin 1976) (zur Übersicht siehe: Shepherd 1994; Kandel et al. 2000). Das Gesangssystem der Vögel stellt in diesem Zusammenhang eines der wesentlichen, etablierten Modelle zur Untersuchung der zugrunde liegenden Prozesse dar (Gurney and Konishi 1980; Nordeen et al. 1989; Nottebohm 1989; Devoogd et al. 1993; MacDougall-Shackleton et al. 1998a; Airey and DeVoogd 2000; Garamszegi and Eens 2004). Es wurden bei Singvögeln beispielsweise Korrelationen zwischen jahreszeitlich bedingten Verhaltensveränderungen und Umbildungen auf neuronaler Ebene beobachtet (Nottebohm 1981; Nottebohm et al. 1986; Tramontin et al. 1999; Ball et al. 2002) und Zusammenhänge zwischen Lernprozessen und morphologischer Umstrukturierung gezeigt (Konishi 1985; Bottjer et al. 1986; Herrmann and Bischof 1986; Nordeen and Nordeen 1988b; Marler 1991b; Marler 1992; Wallhäusser-Franke et al. 1995; MacDougall-Shackleton et al. 1998b; Nixdorf-Bergweiler et al. 1995b; Nixdorf-Bergweiler 1998). Singvögel haben eine angeborene Disposition für ihren art eigenen Gesang (Marler 1991a) und einige Komponenten des Gesangs sind angeboren (Konishi 1965a; Konishi 1965b; Price 1979; Marler 1991a; Braaten and Reynolds 1999), doch um einen normalen arttypischen Gesang äußern zu können, müssen Singvögel diesen arttypischen Gesang zunächst hören und lernen (Thorpe 1958; Thorpe 1961; Eales 1987; Slater et al. 1988; Clayton 1989; Jones et al. 1996). Dies geschieht während einer sensiblen Phase während der Entwicklung von einem Tutor (Marler and Peters 1987; Eales 1989; Houx and Ten Cate 1998). Für das Gesangslernen der meisten Singvögel werden zwei Phasen unterschieden (Marler 1970; Konishi 1985):

- die sensorische Lernphase, während der durch das Hören akustischer Vorbilder die Aufnahme eines Gesangstyps und seine Festlegung im zentralen Nervensystem in Form eines Sollmusters („auditory template“) erfolgt und
- die Gesangsentwicklungsphase, auch als sensomotorische Phase bezeichnet, die durch das motorische Einüben des Gesanges gekennzeichnet ist, indem die

Jungtiere ihren eigenen Gesang über auditorische Rückkopplung an das erlernte Sollmuster anzupassen versuchen (Konishi 1965b).

Wie wichtig diese auditorische Rückkopplung für eine korrekte Gesangsentwicklung ist, belegen zahlreiche Studien (Konishi 1965a; Burek et al. 1991; Schmidt 1996; Doupe 1997; Doupe et al. 1999; Hessler and Doupe 1999; Leonardo and Konishi 1999; Bottjer et al. 2000; Brainard and Doupe 2000a; Rosen and Mooney 2000), die zeigen, dass Vögel, die als Jungtiere vertäubt wurden, niemals einen normalen Gesang entwickeln, auch wenn sie vor der Vertäubung ein reichhaltiges auditorisches Angebot hatten.

Die Gesangsentwicklung der Singvögel beginnt bei den meisten Arten bereits in früher Jugend und dauert zum Teil bis ins Adultstadium an. Mit Eintritt der Geschlechtsreife wird der Balzgesang bei der Partnerwahl eingesetzt. Man unterscheidet zwischen Vogelarten, die noch im Adultstadium Gesang lernen und diesen Gesang sogar jedes Jahr wieder erneuern und erweitern können (sogenannte „open-ended-learners“), und Arten, die den Gesang, wenn er einmal manifestiert ist, nicht mehr verändern (sogenannte „age-limited-learners“). Zu den „open-ended-learners“ werden unter anderem Kanarienvögel (*Serinus canaria*) und Stare (*Sturnus vulgaris*) gezählt, zu den „age-limited-learners“ gehören zum Beispiel Zebrafinken (*Taeniopygia guttata*). „Age-limited-learners“ lernen den arttypischen Gesang in einem bestimmten, altersabhängigen Stadium ihrer Entwicklung. Wenn dieser Zeitraum, der auch als sensible Phase beschrieben wird, beendet ist und die Tiere adult geworden sind, wird der Gesang nicht mehr verändert.

Seit 1976 ist bekannt, dass für die Kontrolle des Gesangsverhaltens ein neuronales Netzwerk im Vorderhirn der Singvögel verantwortlich ist (Nottebohm and Arnold 1976). Dieses neuronale Netzwerk, das auch als neuronales Gesangssystem bezeichnet wird, besteht aus einer Anzahl identifizierter Gehirnregionen, die miteinander verschaltet sind. Das neuronale Gesangssystem ist plastisch und verändert sich während des Gesangslernens (Alvarez-Buylla and Kirn 1997; Clayton 1997; Nordeen and Nordeen 1997). Da sowohl die Struktur als auch die Funktion des Gesangssystems experimentell beeinflusst werden können (Nottebohm et al. 1976; DeVogd and Nottebohm 1981a; Canady et al. 1988; Rollenhagen and Bischof 1991; Kafitz et al. 1992; Wallhäusser-Franke et al. 1995), ist dieses System geeignet zur Untersuchung der Beziehung zwischen Neuronenentwicklung und deren Auswirkung auf die Vokalisation (Stocker et

al. 1994). Struktur (neuronaless Netzwerk) und Funktion (Gesang) können direkt miteinander in Beziehung gesetzt werden.

In der vorliegenden Studie soll am Beispiel des Zebrafinken untersucht werden, welchen Einfluss das Gesangslernen auf anatomische Eigenschaften von Gesangsarealen hat.

1.1. Gesangslernen bei Zebrafinken

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf Untersuchungen an Zebrafinken. Diese äußern, verglichen mit anderen Singvögeln, einen recht einfachen stereotypen Gesang, dessen Erwerb auf einen klar abgegrenzten Zeitraum beschränkt ist und zudem ausschließlich von Männchen vorgetragen wird. Bei Eintritt der Geschlechtsreife benutzen sie ihren Gesang, um Weibchen zu umwerben. Die Paarungsbereitschaft der Zebrafinkenweibchen ist unter anderem davon abhängig, ob zum einen das Männchen in der Lage ist, arttypischen Gesang vorzutragen, und zum anderen, ob das Weibchen diesen Gesang auch als arteigen erkennen kann. Dies bedeutet, dass weibliche Zebrafinken, obwohl sie selbst lediglich angeborene einfache Kontaktrufe äußern, auch das arteigene Gesangsmuster erkennen können müssen. Dabei ist das Gesangsmuster nicht genetisch manifestiert, sondern muss von Männchen und Weibchen erlernt werden (Miller 1979; Cynx and Nottebohm 1992). Wie die meisten Singvögel (Immelmann 1969; Price 1979; Bottjer et al. 1986) sind auch Zebrafinken (Konishi 1965b; Immelmann 1969; Slater et al. 1988; Böhner 1990) darauf angewiesen, während ihrer Gesangsentwicklung Gesang von einem geeigneten Tutor (in der Regel dem Vater) zu hören. Eine Besonderheit bei Zebrafinken ist, dass bei ihnen die Phasen des sensorischen und sensomotorischen Lernens überlappen (Abbildung 1). Bei Zebrafinken findet die Hauptphase des sensorischen Lernens sowohl bei Männchen als auch bei Weibchen in den ersten Lebenswochen statt und klingt zwischen dem 35. und 60. Tag ab (Böhner 1990). In dieser Zeit hören normal aufgezogene Jungtiere akustische Vorbilder - in der Regel den Vater - und nehmen dessen Gesang im Gedächtnis als Sollmuster auf. Nur bei Zebrafinkenmännchen kommt es zu der zweiten, der sensomotorischen Phase des Gesangslernens. Diese beginnt zwischen dem 30. und 40. Tag und dauert ungefähr bis zum 80. Tag (Nottebohm 1993). In dieser Zeit

passt das Männchen seine eigene Vokalisation über auditorische Rückkopplung an das während der Gedächtnisbildung im Gehirn niedergelegte Sollmuster an. Mit etwa 90 Tagen ist der Gesangserwerb bei Zebrafinken abgeschlossen (Böhner 1991).

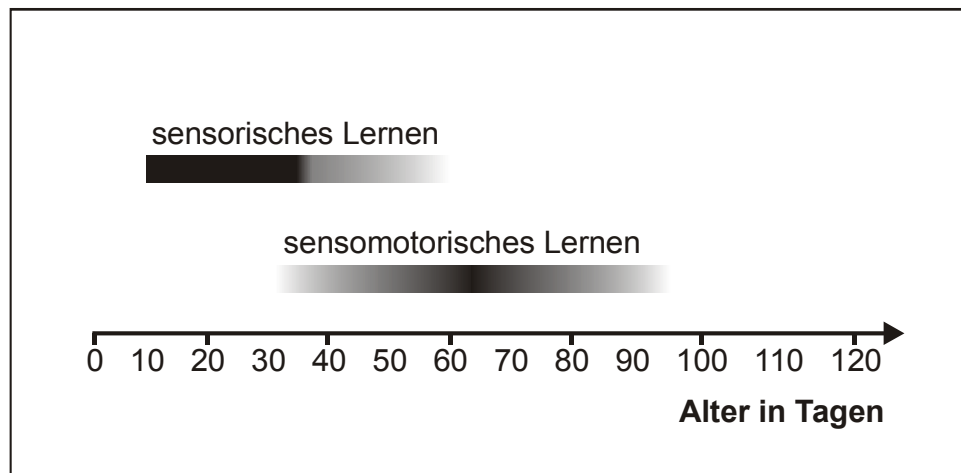


Abb. 1: Zeitlicher Ablauf des Gesangslernens: Die Phase, in der das sensorische Lernen sowohl bei Männchen als auch bei Weibchen stattfindet, dauert etwa vom 10. bis zum 60. Tag. Dieses sensorische Lernen überschneidet sich bei Männchen teilweise mit dem sensomotorischen Lernen, das ungefähr zwischen dem 30. und 100. Tag stattfindet.

1.2. Struktur des Gesangs bei Zebrafinken

Der Gesang des Zebrafinken lässt sich in Strophen, Motive und Elemente untergliedern. Ein Element stellt die kleinste Einheit des Gesangs dar. Jedes Männchen hat ein Repertoire von ungefähr sechs bis zehn Elementen (Price 1979), die in der akustischen Struktur und Dauer (0,05 - 0,11 Sekunden) variieren und durch kurze Pausen (ungefähr zehn Millisekunden) voneinander getrennt sind (Sossinka and Böhner 1980). Elemente werden in einer stereotypen Reihenfolge zu Motiven zusammengefasst (siehe dazu: (Price 1979; Sossinka and Böhner 1980; Cynx 1990; Zann 1996; MacDougall-Shackleton et al. 1998b); Abbildung 2). Männchen präsentieren diese Motive mit einer variierenden Anzahl von Einleitungselementen. Manchmal werden diese Einleitungselemente auch in die Motive mit aufgenommen. Wenn einer Abfolge von Einleitungselementen und Motiven eine Pause von mehr als einer Sekunde folgt, wird diese Abfolge Strophe genannt (Slater 1974). Die Anzahl der Motive pro Strophe variiert je nach der Motivation des Vogels (Sossinka and Böhner 1980; Zann 1996). Man

unterscheidet zwischen an Weibchen gerichtetem Gesang (Balzgesang) und ungerichtet vorgetragenem Gesang. Der gerichtete Gesang (zwei - fünf Sekunden) ist länger als der ungerichtete Gesang (ein - zwei Sekunden) und besitzt eine höhere Anzahl an Motiven pro Strophe sowie mehr einleitende Elemente (Slater 1974; Sossinka and Böhner 1980; Bischof et al. 1981; Böhner et al. 1992). Außer dem auf Verhaltensebene bekannten Unterschieden zwischen gerichtetem und ungerichtetem Gesang sind auch Unterschiede in der Aktivität verschiedener Gehirnareale bekannt (Jarvis et al. 1998).

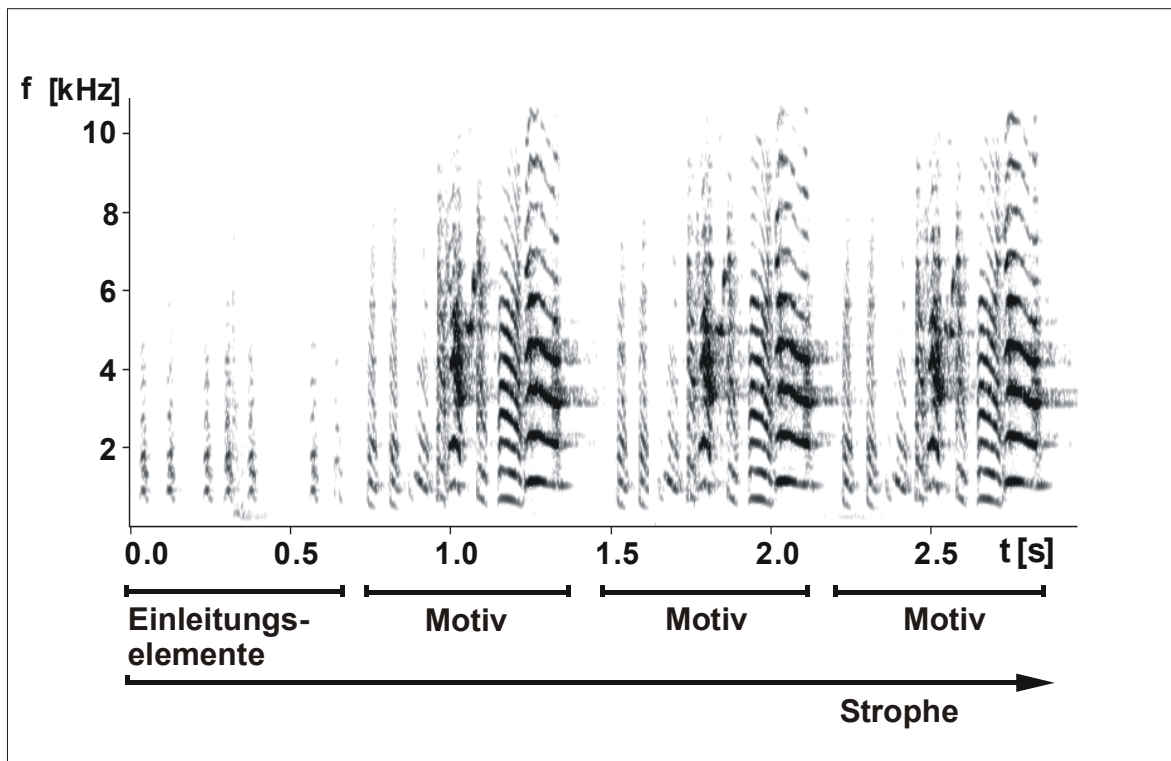


Abb. 2: Sonagramm einer Strophe aus dem Gesang eines adulten, sozial aufgezogenen Zebrafinkenmännchens (modifiziert nach Nixdorf-Bergweiler et al. 1999a).

Abkürzungen: f: Frequenz, kHz: Kilohertz, t: Zeit, s: Sekunden.

1.3. Gesangsentwicklung bei Zebrafinken

Die Vokalisation der Zebrafinkenmännchen kann in mehrere Entwicklungsstufen unterteilt werden. Bereits ab dem dritten Lebenstag werden Bettelrufe geäußert (Immelmann 1969). Stimmföhlungs-laute werden zwischen dem 18. und 28. Tag mit variablen Strukturen und in unregelmäßigen Intervallen vorgetragen. Zwischen dem 20. und 30. Tag tritt erstmals Gesang auf (Böhner 1991). Dieser wird als Jugendgesang bezeichnet. Der Jugendgesang entwickelt sich ungefähr ab dem 30. Tag - aus den zuvor eher einzeln vorgetragenen Rufen - und ist teilweise bereits mit Elementen des Adultgesangs durchsetzt (Arnold 1975). Die Variabilität dieses Jugendgesanges wird bis zum 60. Tag kontinuierlich reduziert, und ab diesem Zeitpunkt sind fast alle Elemente des Adultgesanges vorhanden (Slater et al. 1988). Mit ungefähr 60 Tagen erreicht die Gesangsaktivität das Niveau adulter Tiere (Böhner 1991). Die Ausbildung der Frequenz-Zeit-Struktur der einzelnen Gesangselemente ist zwischen dem 60. und 90. Tag weitgehend abgeschlossen (Böhner 1991). Die Festlegung der Elemente zu starren Elementsequenzen (Motiven), die für den Adultgesang kennzeichnend sind, vollzieht sich zwischen dem 75. und 105. Tag (Böhner 1991). Aus einem anfangs sehr variablen plastischen Jugendgesang hat sich ein stereotypes Gesangsmuster entwickelt (Immelmann 1969; Böhner 1981), das Zebrafinken ihr ganzes Leben lang beibehalten.

1.4. Das neuronale Gesangssystem

Für die Kontrolle des Gesangsverhaltens ist ein neuronales Netzwerk im Vorderhirn der Singvögel verantwortlich (Nottebohm and Arnold 1976). Es besteht aus einer Anzahl identifizierter Gehirnregionen, die miteinander verschaltet sind (Abbildung 3). Bei den Gehirnregionen, die auch als Gesangsareale bezeichnet werden, handelt es sich um anatomisch abgrenzbare Zellansammlungen. Das neuronale Gesangssystem ist plastisch und verändert sich während des Gesangslernens in anatomischer, neurochemischer und molekularer Hinsicht (Alvarez-Buylla and Kirn 1997; Clayton 1997; Nordeen and Nordeen 1997).

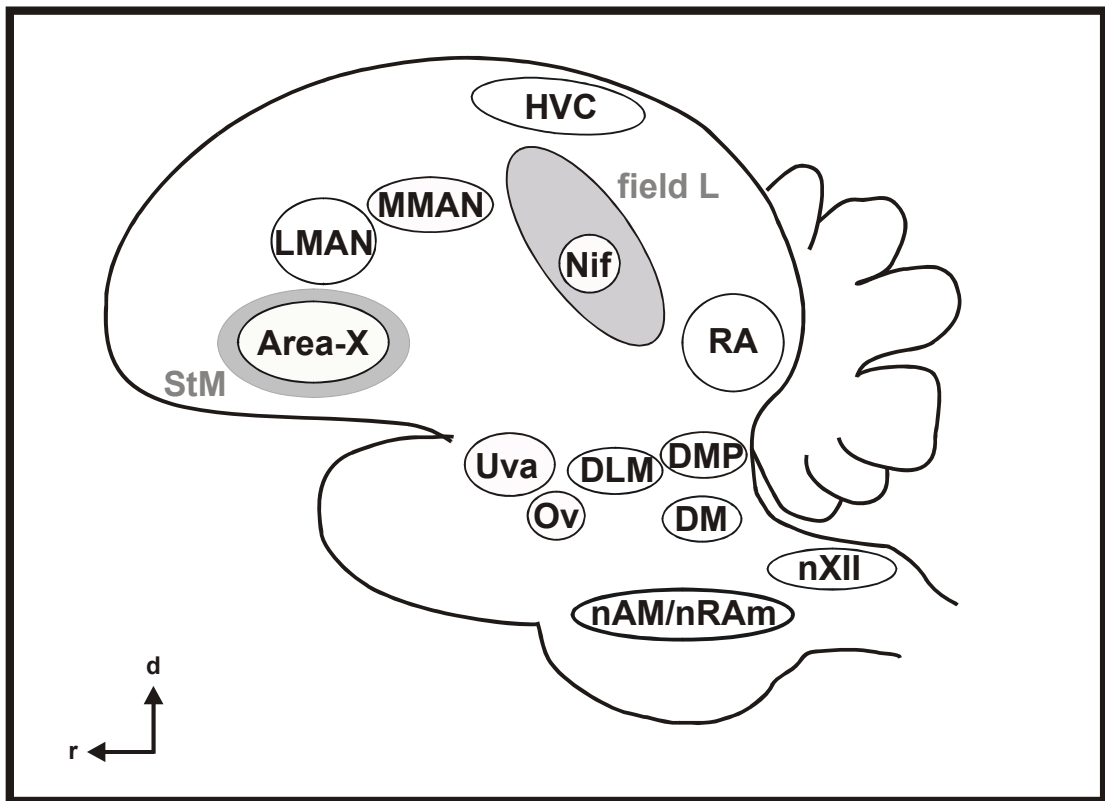


Abb. 3: Schematische Darstellung zur Lage der Gesangsareale beim Zebrafinkenmännchen; Sagittalan­sicht (Abkürzungen: DLM: Nucleus dorsolateralis medialis des anterioren Thalamus, DM: Dorsomedialer Teil des Nucleus intercollicularis, DMP: Posteriorer Anteil des dorsomedialen Nucleus des Thalamus, LMAN: Nucleus lateralis magnocellularis nidopallii anterioris, MMAN: Nucleus medialis magnocellularis nidopallii anterioris, Nif: Nucleus interfascicularis nidopallii, nAM: Nucleus ambiguus, nRAm: Nucleus retroambiguus, nXII: Nucleus nervi hypoglossi, Ov: Nucleus ovoidalis, RA: Nucleus robustus arcopallii, StM: Striatum mediale, Uva: Nucleus uvulaeformis; d: dorsal, r: rostral).

1.4.1. Kerngebiete des Gesangssystems

Die im Folgenden aufgeführten Gehirnnareale werden entlang der Projektion der „anterioren Vorderhirnschleife“ beschrieben, auf welche im Anschluss (Abschnitt 1.4.2.) noch im Detail eingegangen wird. Die in dieser Arbeit verwendeten Namen und Abkürzungen richten sich nach der neu eingeführten Nomenklatur (Reiner et al. 2004). Die bisher für Vögel verwendete Nomenklatur ist überarbeitet worden, um sie an die Säugerliteratur anzugleichen. Hierbei wurde darauf geachtet etablierte Abkürzungen weitestgehend beizubehalten.

1.4.1.1. HVC

Der HVC ist eine telencephale Gesangsregion und wurde 1976 von Nottebohm und seinen Mitarbeitern (Nottebohm et al. 1976) identifiziert, wobei angenommen wurde, dass sich diese Struktur im Hyperpallium (ehemals Hyperstriatum) befindet, daher der ursprüngliche Name *Hyperstriatum ventrale pars caudalis* (HVc). Später wurde jedoch klar, dass sich der HVc nicht im Hyperpallium, sondern im Nidopallium befindet (Paton et al. 1981). Um die ursprüngliche Abkürzung erhalten zu können, schlug Nottebohm 1987 eine Umbenennung in „high(er) vocal center“ (HVC) vor (Nottebohm 1987). Nach der neu überarbeiteten Nomenklatur wird das Acronym HVC verwendet (Reiner et al. 2004). Der HVC ist sowohl am Gesangslernen junger Vögel (Nottebohm 1993) als auch an der Gesangsproduktion adulter Vögel beteiligt (Nottebohm et al. 1976; McCasland and Konishi 1981; Vu et al. 1994; Ward et al. 1998). Bei der motorischen Kontrolle nimmt er innerhalb des neuronalen Netzwerkes des Gesangssystems eine Schlüsselposition ein (Vu et al. 1994). Er steuert während des Singens die zeitliche Abfolge der einzelnen Silben und Motive (Vu et al. 1994). Das HVC-Volumen nimmt bei Männchen während der Gesangsentwicklungsphase zu. Diese Volumenzunahme soll sowohl durch Einwanderung als auch durch lokale Neubildung von Neuronen begründet sein (Bottjer et al. 1985; Nottebohm 1985; Bottjer et al. 1986; Nordeen and Nordeen 1988a; Nordeen and Nordeen 1988b; Alvarez-Buylla et al. 1990b). Die Entwicklung des HVC ist bei männlichen und weiblichen Zebrafinken sehr unterschiedlich. Juvenile, erst zehn Tage alte Zebrafinken weisen bezüglich des HVC-Volumens und der Neuronenanzahl noch keine geschlechtsspezifischen Unterschiede auf (Kirn and DeVoogd 1989). Doch während das Volumen im weiteren Entwicklungsverlauf bei Weibchen bis zum 40. Tag schrumpft, steigt es bei Männchen bis zum 20. Tag auf das Dreifache an und beträgt im Alter von 40 Tagen schon 91 % des adulten Kernvolumens (Nixdorf-Bergweiler 1996). Das adulte Kernvolumen ist mit 60 Tagen erreicht und ist dreieinhalbmal größer als das Volumen zehntägiger Tiere (Nixdorf-Bergweiler 1996). Auch die Neuronenanzahl ist im HVC bei zehntägigen Zebrafinkenmännchen und Zebrafinkenweibchen noch gleich (Kirn and DeVoogd 1989). Zwischen dem 20. und 40. Lebenstag ist jedoch die Anzahl pyknotischer Zellen bei Weibchen mehr als doppelt so

hoch als bei Männchen (Kirn and DeVoogd 1989). Bei Männchen steigt die Neuronenanzahl (trotz Zelltod) zwischen dem 25. und 30. Lebenstag um ein Drittel an (Bottjer et al. 1986). Bei männlichen Zebrafinken dauert die sensible Phase für das Gesangslernen vom 10. - 65. Tag (Immelmann 1969; Price 1979; Eales 1985). In diesem Zeitraum verdoppelt sich bei Männchen die Neuronenanzahl im HVC (Kirn and DeVoogd 1989).

Der HVC erhält auditorische Informationen über direkte (Fortune and Margoliash 1992) und indirekte (Kelley and Nottebohm 1979) Verbindungen aus dem komplexen Gebiet „field L“, einem nidopallialem Hirnareal im caudalen Telencephalon, das bei Vögeln die primäre Endstation der Höhrbahn darstellt (Kelley and Nottebohm 1979; Saini and Leppelsack 1981; Ehret 1996; Vates et al. 1996), (Abbildung 3, siehe dazu auch Abschnitt 1.4.2.). Vom HVC ausgehend ziehen innerhalb des Gesangssystems direkte afferente Fasern in den *Nucleus robustus arcopallii* (RA) und in die Area-X (Nottebohm et al. 1982; Bottjer et al. 1984; Mooney and Rao 1994; Spiro et al. 1999).

1.4.1.2. Area-X

Die Area-X ist im medialen Teil des Striatums (*Striatum mediale*; StM) gelegen. Aufgrund ihrer neurochemischen, anatomischen, entwicklungsbiologischen und physiologischen Eigenschaften ist die Area-X mit den Basalganglien der Säuger vergleichbar (Bottjer and Johnson 1997; Luo and Perkel 1999; Perkel and Farries 2000). Obwohl die Area-X eher an der Gedächtnisbildung als an der Gesangsproduktion beteiligt zu sein scheint (Scharff and Nottebohm 1991), konnte sie bisher nur bei den Männchen nachgewiesen werden (Arnold et al. 1986). Während der Entwicklung nimmt das Volumen der Area-X bei Männchen zu. Mit 40 Tagen ist das Volumen auf das vierfache Volumen von zehn Tage alten Männchen angestiegen und hat die Größe von adulten Tieren erreicht (Nixdorf-Bergweiler 1996). Die Area-X ist das größte Kerngebiet des Gesangssystems bei adulten Männchen (Nottebohm and Arnold 1976; Ryan and Arnold 1981). Sie wird sowohl vom HVC (Mooney and Rao 1994) als auch vom *Nucleus lateralis magnocellularis nidopallii anterioris* (LMAN) innerviert (Nixdorf-Bergweiler et al. 1995a; Vates and Nottebohm 1995; Luo et al. 2001) und projiziert in den *Nucleus dorsolateralis medialis des anterioren Thalamus* (DLM).

1.4.1.3. Nucleus dorsolateralis medialis des anterioren Thalamus (DLM)

Beim Zebrafinken wurde der *Nucleus dorsolateralis medialis des anterioren Thalamus* (DLM) erstmals von Bottjer und Mitarbeitern (Bottjer et al. 1989) als separater Kern dorsal des *Nucleus ovoidalis* (Ov) beschrieben. Aufgrund der Zugehörigkeit des DLM zur „anterioren Vorderhirnschleife“ (siehe Abschnitt 1.4.2.2.) (Bottjer et al. 1989; Williams 1989) wird er mit dem frühen Gesangserwerb in Verbindung gebracht. Durch besonders große Somata hebt sich der DLM im Nissl-gefärbten Präparat deutlich vom umliegenden Gewebe ab (Bottjer et al. 1989). Während das DLM-Volumen bei Männchen im Entwicklungsverlauf abnimmt, bleibt die Neuronenanzahl des DLM konstant und die Neuronendichte nimmt zu (Johnson and Bottjer 1992). Der DLM erhält Projektionen aus der Area-X und projiziert seinerseits in den *Nucleus lateralis magnocellularis nidopallii anterioris* (LMAN) (Bottjer et al. 1989). Außerdem projizieren Neurone des RA in den DLM (Wild 1993b; Wild 1993a; Vates et al. 1997). Diese Verbindungen sind topografisch organisiert (Johnson et al. 1995; Vates and Nottebohm 1995; Luo et al. 1999).

1.4.1.4. Nucleus lateralis magnocellularis nidopallii anterioris (LMAN)

Arnold und seine Mitarbeiter beschrieben erstmals 1976 die im anterioren Vorderhirn gelegene Hirnkernregion *Nucleus magnocellularis nidopallii anterioris* (MAN) (Arnold et al. 1976). Der MAN konnte bei Zebrafinken und weiteren Singvogelarten nachgewiesen werden, fehlt jedoch bei Nicht-Singvögeln, wie beispielsweise Hühnern und Tauben (Arnold et al. 1976). Studien an Kanarienvögeln zeigten wie der MAN aufgebaut und in das Gesangssystem der Singvögel integriert ist (Nottebohm et al. 1982; Okuhata and Saito 1987). An Zebrafinken wurde der MAN zunächst mittels Läsionsstudien untersucht (Bottjer et al. 1984). Später wurde die Morphologie des MAN und dessen Verbindungen im Detail analysiert (Bottjer et al. 1989). Diese Untersuchungen ergaben, dass sich der MAN aus einem medialen (MMAN) und einem lateralen (LMAN) Teil zusammensetzt. Diese beiden Teile sind durch nidopalliales Gewebe voneinander

getrennt. Sie unterscheiden sich sowohl bezüglich ihrer Morphologie als auch hinsichtlich ihrer Einbindung in das Gesangssystem. Während der MMAN in den HVC projiziert (Bottjer et al. 1984; Foster et al. 1997; Vates et al. 1997) und an der Gesangsproduktion beteiligt ist (Foster and Bottjer 1993; Foster et al. 1997), spielt der LMAN eine entscheidende Rolle beim Gesangserwerb (Bottjer et al. 1984; Sohrabji et al. 1990; Scharff and Nottebohm 1991; Johnson 1998; Iyengar and Bottjer 2002b; Iyengar and Bottjer 2002a). Das zeigten Versuche, in denen der LMAN juveniler Männchen, die den Gesang noch nicht gelernt hatten, zerstört wurde. Diese LMAN läsierten Männchen waren nicht mehr in der Lage, den arttypischen Gesang zu lernen (Johnson 1998). Für die adulte Gesangsproduktion schien der LMAN zunächst von geringer Bedeutung zu sein, da LMAN-Läsionen bei adulten Zebrafinkenmännchen mit normal ausgeprägtem Gesang vorerst keinen offensichtlichen Einfluss auf den Gesang hatten (Bottjer and Arnold 1984; Bottjer et al. 1984; Sohrabji et al. 1990; Scharff and Nottebohm 1991; Halsema and Bottjer 1992; Nordeen and Nordeen 1993). Spätere Versuche zeigten demgegenüber, dass der LMAN auch bei adulten Tieren eine Rolle bei der Gesangsproduktion spielt. So konnte in Untersuchungen, in denen der LMAN bilateral läsiert wurde, eine Veränderung der Gesangsgeschwindigkeit beobachtet werden. Männchen, denen der LMAN läsiert worden war, sangen mehr als 16 % schneller als Männchen mit intaktem LMAN (Williams and Metha 1999). Wurden adulte Männchen zunächst vertäubt und dann der LMAN bilateral läsiert, blieben Veränderungen des Gesangs aus (Brainard and Doupe 1997; Brainard and Doupe 2000a; Brainard and Doupe 2000b). Außerdem zeigten elektrophysiologische Untersuchungen am LMAN adulter Tiere während der Gesangsproduktion aktive Neurone im LMAN (Hessler and Doupe 1997). Darüber hinaus ist bekannt, dass der LMAN adulter Männchen bei der Diskriminierung zwischen eigenem Gesang (bird own song; BOS) und dem Gesang eines anderen Zebrafinken beteiligt ist (Scharff et al. 1998).

Morphologische Untersuchungen am LMAN zeigten, dass sich das LMAN-Gesamtvolumen während der Ontogenese verkleinert (Bottjer et al. 1985; Nordeen and Nordeen 1988a; Bottjer and Sengelaub 1989; Burek et al. 1991; Korsia and Bottjer 1991; Nixdorf-Bergweiler 1996). Diese Reduktion findet bei Männchen und Weibchen gleichermaßen statt (Nixdorf-Bergweiler 1996). Auf zellulärer Ebene verläuft die Entwicklung des LMAN bei Männchen und Weibchen ab dem 40. Tag unterschiedlich: während bei Männchen die Zellgröße zwischen dem 40. und 60. Tag um ungefähr 40 %

ansteigt und dadurch die Größe von adulten Tieren erreicht hat, nimmt bei Weibchen die Zellgröße zwischen dem 40. und 60. Tag um etwa 60 % ab (Nixdorf-Bergweiler 1998). Die Somata adulter Männchen sind ungefähr dreimal größer als die adulter Weibchen (Nordeen et al. 1987a; Nixdorf-Bergweiler 1998).

Der LMAN wird vom DLM innerviert (Bottjer et al. 1989; Johnson et al. 1995). Vom LMAN aus gibt es sowohl direkte Afferenzen in den *Nucleus robustus arcopallii* (RA) (Nottebohm et al. 1982; Bottjer et al. 1989) als auch Projektionen zurück in die Area-X (Nixdorf-Bergweiler et al. 1995a; Vates and Nottebohm 1995; Iyengar et al. 1999; Luo et al. 2001).

1.4.1.5. Nucleus robustus arcopallii (RA)

Ebenso wie der HVC und der MAN wurde auch der *Nucleus robustus arcopallii* (RA) 1976 von Nottebohm und Mitarbeitern identifiziert und benannt ((Nottebohm et al. 1976) damals als: *Nucleus robustus archistriatalis*). Wie der Name schon sagt, ist der RA im *Arcopallium* gelegen. Bereits bei fünf Tage alten Zebrafinken ist er durch seine Neuronendichte deutlich vom umliegenden arcopallialen Gewebe zu unterscheiden. Der Ablauf der RA-Entwicklung ist entscheidend für die Ausbildung eines korrekten Gesangs (Akutagawa and Konishi 1994), da der RA sowohl indirekt am Gesangslernen junger Vögel (Nottebohm 1993) als auch direkt an der Gesangsproduktion adulter Vögel beteiligt ist (Nottebohm et al. 1976; McCasland and Konishi 1981). Das Gesangslernen der Vögel in der sensiblen Phase steht in engem Zusammenhang mit der Plastizität von Synapsen im RA (Sakaguchi 1997). Ist das Gesangssystem erst einmal voll ausgebildet, bewirken kurzfristige Störungen an RA-Neuronen adulter Männchen lediglich eine Störung der gerade gesungenen Silbe, sie haben jedoch keine Auswirkungen auf die Anordnung oder Reihenfolge der Silben (Vu et al. 1994). Der RA generiert ein phasisches und zeitlich präzises neuronales Signal, welches während des Singens die Motoneurone, die die Vokalisation und Respiration beeinflussen, steuert (Spiro et al. 1999).

Die RA-Volumenentwicklung verläuft bei Männchen und Weibchen unterschiedlich: Während bei Männchen das RA-Volumen innerhalb der Gesangsentwicklung bis etwa zum 70. Tag zunimmt, wird es bei Weibchen rückgebildet (Bottjer et al. 1985; Konishi and Akutagawa 1985; Bottjer et al. 1986; Nordeen and Nordeen 1988a; Kirn and

DeVoogd 1989; Nixdorf-Bergweiler 1996). Das RA-Volumen bei Weibchen schrumpft zwischen dem 20. und dem 40. bis 45. Tag um die Hälfte (Konishi and Akutagawa 1985; Konishi and Akutagawa 1987; Nordeen and Nordeen 1988a; Kirn and DeVoogd 1989; Nixdorf-Bergweiler 1996). Die Neuronenanzahl im RA ist vor Beginn des Gesangslernens bei juvenilen Männchen und Weibchen gleich. Während jedoch die Neuronenanzahl im RA bei Männchen während der Gesangsentwicklung konstant bleibt, nimmt sie bei Weibchen, bedingt durch Apoptose, stark ab (Konishi and Akutagawa 1985; Kirn and DeVoogd 1989; Nordeen and Nordeen 1996).

Der RA stellt den Ausgang des telencephalen Gesangssystems der Singvögel dar (Vicario and Raksin 2000). Er erhält Eingänge vom HVC und vom LMAN (Nottebohm et al. 1982; Bottjer et al. 1989; Kubota and Saito 1991; Mooney and Konishi 1991). Der RA projiziert seinerseits zu Gebieten des Hirnstamms, die in die Kontrolle der Syrinx – dem lauterzeugenden Organ der Vögel - und der Respiration involviert sind (Vicario 1991; Vicario 1993; Wild 1993a; Wild 1993b; Vicario 1994; Wild 1994; Spiro et al. 1999). Projektionsneurone aus dem ventralen Bereich des RA projizieren zu den hypoglossalen Motoneuronen (Vicario 1993), die die Muskeln der Syrinx innervieren. Projektionsneurone aus dem dorsalen Teil des RA projizieren entweder direkt oder indirekt über den „dorsomedialen“ Teil des *Nucleus intercollicularis* (DM) zum *Nucleus ambiguus* / *Nucleus retroambiguus* (nAM / nRAm), der den Larynx und die expiratorischen Motoneurone ansteuert (Spiro et al. 1999). Außerdem projizieren Neurone aus dem dorsalen Teil des RA in den posterioren Anteil des dorsomedialen Nucleus des Thalamus (DMP) (Vates et al. 1997; Iyengar et al. 1999; Li et al. 1999) und auch in den DLM (Wild 1993b; Vates et al. 1997) (siehe auch Abschnitt 1.4.2.1.).

1.4.1.6. Nucleus nervi hypoglossi (nXII)

Der *Nucleus nervi hypoglossi* (nXII) ist im Hirnstamm der Vögel gelegen. Er spielt eine entscheidende Rolle bei der Vokalisation, da er die Syrinx innerviert (siehe Tabelle 1). Der nXII wird vom RA direkt und indirekt über den DM innerviert. Diese Projektionen vom RA zum nXII sind topografisch organisiert. Es projizieren einerseits Fasern aus dem dorsalen Teil des RA in den DM und von dort zum nXII (Vicario 1993), während andererseits Fasern aus dem ventralen Teil des RA direkt den nXII innervieren (Vicario 1993; Wild 1993a; Wild 1993b; Vicario 1994; Wild 1994; Spiro et al. 1999). Der nXII seinerseits projiziert direkt zur Syrinx.

1.4.1.7. Überblick zur Lokalisation und Funktion der vorgestellten Gesangsareale

Die Funktionen der beschriebenen Gehirnareale lassen sich, wie in Tabelle 1 dargestellt, zusammenfassen.

	Lokalisation	Funktion
HVC	Nidopallium	beteiligt am Gesangslernen und der Gesangsproduktion; steuert zeitliche Abfolge der einzelnen Silben & Motive
Area-X	Striatum	beteiligt an der Gedächtnisbildung
DLM	anteriorer Thalamus	beteiligt am frühen Gesangserwerb
LMAN	anteriores Nidopallium	beteiligt am frühen Gesangserwerb und an der auditorischen Rückkopplung
RA	Arcopallium	beteiligt an der Gesangsproduktion; steuert Motoneurone für Respiration & Vokalisation
nXII	Hirnstamm	innerviert die Syrinx

Tab. 1: Überblick zur Lokalisation und zu bisher bekannten Funktionen der Gesangsareale HVC, Area-X, DLM, LMAN und RA und des nXII im Zebrafinken.

1.4.2. Konnektivitäten innerhalb des Gesangssystems

Das neuronale Gesangssystem der Singvögel erhält auditorische Informationen aus dem „field L“, einem nidopallialem Hirnareal im caudalen Telencephalon, das bei Vögeln die primäre Endstation der Höhrbahn darstellt (Kelley and Nottebohm 1979; Saini and Leppelsack 1981; Ehret 1996; Vates et al. 1996; Janata and Margoliash 1999; Gehr et al. 2000). Das „field L“ besteht aus fünf verschiedenen Untereinheiten, die als L1, L2a, L2b, L3, und L bezeichnet werden (Fortune and Margoliash 1992). Das „field L“ selbst wird nicht zum Gesangssystem gezählt, wohl aber projizieren Neurone vom „field L“ in den HVC (Fortune and Margoliash 1992; Fortune and Margoliash 1995; Vates et al. 1996; Mello et al. 1998) und in den RA (Vates et al. 1996).

Innerhalb des Gesangssystems unterscheidet man zwei Hauptnetzwerke, die an dem Gesangsverhalten maßgeblich beteiligt sind. Eine „prämotorische Bahn“ (siehe Abschnitt 1.4.2.1. und Abbildung 4), die für die Produktion des Gesangs wichtig ist, und eine „anteriore Vorderhirnschleife“ (siehe Abschnitt 1.4.2.2. und Abbildung 4), die mit Lernprozessen bezüglich des Gesangsverhaltens in Verbindung gebracht wird.

1.4.2.1. Die „prämotorische Bahn“

Die „prämotorische Bahn“ kontrolliert Gehirnareale des Vorderhirns, des Mittelhirns und des Hirnstamms, die wiederum die Muskeln des Stimmapparates und der Respiration regulieren. Die Projektionen der „prämotorischen Bahn“ verlaufen vom Kerngebiet des *Nucleus uvulaeformis* (Uva) im Thalamus zum *Nucleus interfascicularis nidopallii* (Nlf) im Nidopallium über den HVC im Telencephalon zum RA (zur Übersicht siehe (Margoliash 1997)). Der RA schließlich projiziert zu Kerngebieten des Zwischenhirns (DLM (Wild 1993b; Vates et al. 1997)), des Mittelhirns (DMP (Foster and Bottjer 1992; Foster et al. 1997), DM (Vicario 1991)) und des Hirnstamms (nXII (Vicario and Nottebohm 1988), nAM, nRAm (Wild 1993a; Wild 1993b)). Während der nRAm für die Respiration relevante Muskeln innerviert, innerviert der nXII die Syrinx, das lauterzeugende Organ der Vögel (Wild 1997). Die „prämotorische Bahn“ ist das ganze Leben hindurch

maßgeblich an der Gesangsproduktion beteiligt (Arnold et al. 1976; Nottebohm et al. 1976; Nottebohm et al. 1982).

1.4.2.2. Die „anteriore Vorderhirnschleife“

Vom HVC ausgehend gibt es neben der direkt zum RA projizierenden „prämotorischen Bahn“ noch eine indirekte Verbindung zum RA, die auch als „anteriore Vorderhirnschleife“ (anterior forebrain pathway; AFP) bezeichnet wird (Nottebohm et al. 1982; Okuhata and Saito 1987; Bottjer et al. 1989; Williams et al. 1989; Doya and Sejnowski 1995; Vates and Nottebohm 1995). Diese AFP verläuft vom HVC ausgehend über die Area-X, den DLM und den LMAN zum RA; weiterhin ziehen Fasern vom LMAN ausgehend auch in die Area-X (Nixdorf-Bergweiler et al. 1995a; Vates and Nottebohm 1995) (Abbildung 4). Die Verbindungen vom LMAN über die Area-X zum DLM (Vates and Nottebohm 1995; Luo et al. 1999) und vom DLM über den LMAN zum RA (Johnson and Bottjer 1994; Johnson et al. 1995; Luo et al. 1999) sind topografisch organisiert (Luo et al. 2001; Iyengar and Bottjer 2002a). Die anatomischen Verbindungen der AFP sind ungefähr ab dem 20. Lebenstag erstellt (Mooney and Rao 1994).

Derzeit wird der Begriff AFP in der aktuellen Literatur nicht einheitlich gebraucht. So wird die AFP einerseits einschließlich der Kerngebiete HVC und RA beschrieben (Farries 2004, Reiner et al. 2004) und andererseits ohne diese (Brainard 2004, Doupe et al. 2004, Konishi 2004). In der vorliegenden Arbeit wird der Begriff der AFP einschließlich der Projektionswege vom HVC zur Area-X und vom LMAN zum RA verwendet.

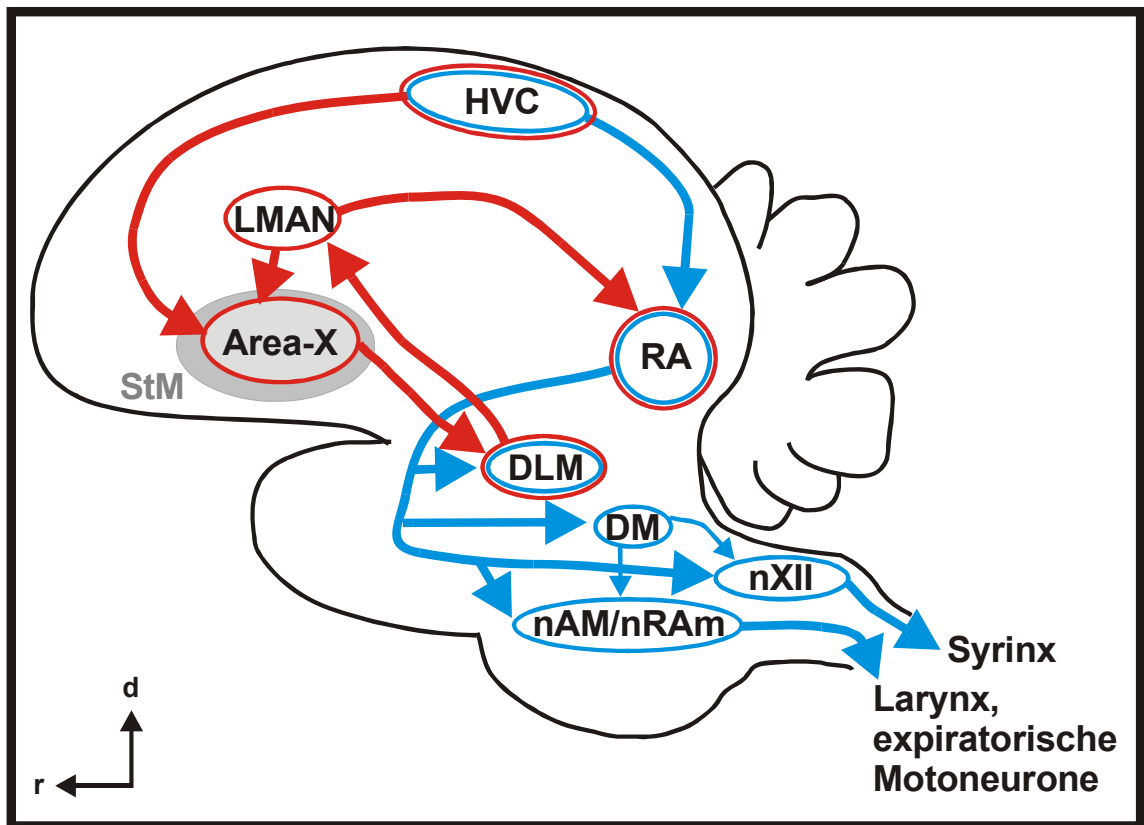


Abb. 4: Selektive schematische Darstellung der Kerngebiete des Gesangssystems eines adulten Zebrafinkenmännchens; Sagittalan­sicht; blaue Projektionen: prämotorische Bahn; rote Projektionen: anteriore Vorderhirnschleife (Abkürzungen: DLM: Nucleus dorsolateralis medialis des anterioren Thalamus, DM: Dorsomedialer Teil des Nucleus intercollicularis, LMAN: Nucleus lateralis magnocellularis nidopallii anterioris, nAM: Nucleus ambiguus, nRAm: Nucleus retroambigualis, nXII: Nucleus nervi hypoglossi, RA: Nucleus robustus arcopallii, StM: Striatum mediale; d: dorsal, r: rostral).

Funktionell wird die AFP mehr dem Gesangslernen und weniger der Gesangsproduktion zugeordnet (Bottjer et al. 1984; Sohrabji et al. 1990; Scharff and Nottebohm 1991; Brainard and Doupe 2000b). Es ist bekannt, dass die AFP für die Lautäußerung junger Zebrafinken während der Gesangslernphase notwendig ist, nicht jedoch für adulte Vögel, um bereits erlernten Gesang vorzutragen (Bottjer et al. 1984; Sohrabji et al. 1989; Scharff and Nottebohm 1991). Des Weiteren ist bekannt, dass die AFP beim Erkennen von arteigenem Gesang eine Rolle spielt (Doupe and Solis 1997; Margoliash 1997; Scharff et al. 1998; Solis and Doupe 2000). Die AFP könnte bei der Gedächtnisbildung eine Rolle spielen, welche auch bei Weibchen eine Funktion bei der Abspeicherung eines Gesangsmusters haben könnte. Allerdings sind die meisten an der AFP beteiligten Hirnareale sexualdimorph ausgebildet. So sind die Areale HVC und

RA bei Weibchen kleiner als bei Männchen und die im StM gelegene Region Area-X ist nur bei Männchen darstellbar (Nottebohm and Arnold 1976). Bei Weibchen gibt es im StM keine klar umgrenzte Kernregion. Einzig der LMAN ist bei Weibchen gleich groß wie bei Männchen (Nixdorf-Bergweiler 1996; Hamilton et al. 1998). Auch ist zur Zeit noch nicht eindeutig geklärt, ob die Projektionen der AFP bei Männchen und Weibchen gleich verlaufen.

1.5. Morphologische Korrelate neuronaler Plastizität

Das Gesangslernen bei Vögeln ist ein etabliertes Modell, um Mechanismen zu untersuchen, die an Lernprozessen beteiligt sind (Gurney and Konishi 1980; Nordeen et al. 1989; Nottebohm 1989; DeVoogd et al. 1993; MacDougall-Shackleton et al. 1998a; Airey and DeVoogd 2000). Im Folgenden werden zwei Ansätze zur Untersuchung von Korrelationen zwischen Verhaltensebene und morphologischer Ebene während Lernprozessen vorgestellt. In Abschnitt 1.5.1. wird die sexualdimorphe Gesangsentwicklung und in Abschnitt 1.5.2. die veränderte Gesangsentwicklung nach deprivierter Aufzucht beschrieben.

1.5.1. Sexualdimorphismus

Bei Zebrafinken, wie auch bei vielen anderen Singvogelarten, wird der Gesang ausschließlich von Männchen vorgetragen. Für diesen auf Verhaltensebene stark ausgeprägten Sexualdimorphismus sind Korrelate auf neuronaler Ebene bekannt. Es gibt zum Beispiel geschlechtsspezifische Unterschiede innerhalb des neuronalen Gesangssystems bezüglich der Verschaltung einzelner Gesangsareale. Die prämotorische Bahn, von der man weiß, dass sie maßgeblich an der Gesangsproduktion beteiligt ist (Arnold et al. 1976; Nottebohm et al. 1976; Nottebohm et al. 1982), ist bei Zebrafinkenweibchen nicht so ausgebildet wie bei Männchen. Bei Weibchen wird die zur prämotorischen Bahn gezählte Projektion vom HVC zum RA nicht ausgebildet (Nottebohm and Arnold 1976; Konishi and Akutagawa 1985; Williams 1985; Mooney and Rao 1994). Diese Verbindung erfolgt bei Männchen ab dem 35. Tag

(Konishi and Akutagawa 1985). Bei adulten Weibchen enden die vom HVC ausziehenden Faserbündel „blind“ vor dem RA, ohne diesen zu innervieren (Mooney and Rao 1994). Im Gegensatz dazu postulieren Wang und Mitarbeiter anhand einer Studie mit spannungssensitiven Farbstoffen, dass eine Verbindung zwischen HVC und RA bei Zebrafinkenweibchen existiert (Wang et al. 1999). Allerdings können die Autoren keine Aussage darüber treffen, ob diese Verbindung direkter oder indirekter Natur ist.

Der Kontaktruf, der von Zebrafinkenmännchen und -weibchen geäußert wird, unterscheidet sich zwischen den Geschlechtern (Zann 1984; Zann 1985). Während der Kontaktruf der Weibchen angeboren ist, enthält der der Männchen auch erlernte, frequenzmodulierte Komponenten. Diese werden durch Modulation des expiratorischen Luftstroms erzeugt (Simpson and Vicario 1990) und erfolgen unter Kontrolle der Gesangsareale HVC und RA (Simpson and Vicario 1990). Nach Läsionen des HVC und / oder des RA äußern Männchen nur noch unmodulierte Kontaktrufe, wie sie für Weibchen typisch sind (Simpson and Vicario 1990). Weibchen benötigen für die Erzeugung von Kontaktrufen die telencephale Verbindung zwischen HVC und RA nicht (Simpson and Vicario 1990).

Darüber hinaus unterscheiden sich Zebrafinkenmännchen und -weibchen durch die Ausbildung der zum Gesangssystem gezählten Gehirnareale. Die meisten Gesangsareale der Männchen sind größer als die der Weibchen (Nottebohm and Arnold 1976; Nixdorf-Bergweiler 1996) (Abbildung 5). Auch verfügen die Gesangsareale der männlichen Tiere über größere Neurone (Nordeen et al. 1987a; Nordeen et al. 1987b; Nixdorf-Bergweiler 1998) und über einen größeren Anteil androgen-akkumulierender Zellen (Arnold 1980b; Arnold 1980a; Gurney 1981). Ebenso treten in der Dendritenmorphologie (DeVoogd and Nottebohm 1981b; Nixdorf et al. 1989b) und in der Anzahl und Ausbildung der synaptischen Kontakte geschlechtsspezifische Unterschiede auf (Nixdorf-Bergweiler 2001).

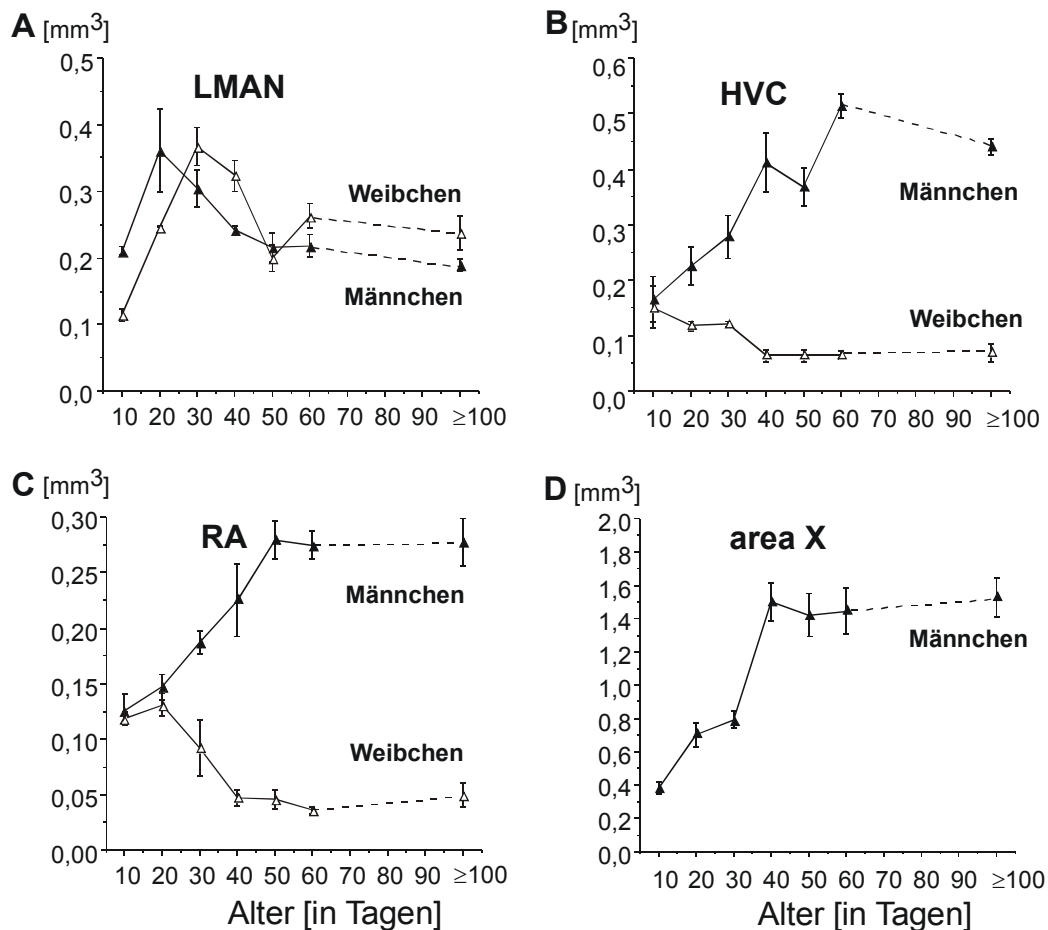


Abb. 5: Vergleich der Volumenentwicklung der Gesangsareale LMAN (A), HVC (B), RA (C) und Area-X (D) zwischen Zebrafinkenmännchen und Zebrafinkenweibchen im Zeitraum von zehn bis 100 Tagen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler. Während die Entwicklung des LMAN-Volumens bei Männchen und Weibchen sehr ähnlich verläuft, ist sie in den Gesangsarealen HVC und RA sehr unterschiedlich. Zudem ist die Area-X nur bei Männchen nachweisbar (verändert nach Nixdorf-Bergweiler 1996).

Ausschlaggebend für das sexualdimorph geprägte Verhältnis bei Zebrafinken ist die An- oder Abwesenheit von Steroidhormonen während der Entwicklung. Werden Zebrafinkenweibchen bald nach dem Schlüpfen mit Steroidhormonen behandelt, entwickeln sie Gesangsareale, die denen von Männchen mehr ähneln als denen unbehandelter Weibchen (Gurney 1981; Gurney 1982; Nordeen et al. 1987a; Nordeen et al. 1987b). Durch Hormongabe können Weibchen männchentypische Kontaktrufe mit frequenzmoduliertem Anteil äußern (Simpson and Vicario 1990; Simpson and Vicario 1991a). Bei diesen hormonbehandelten Weibchen ist auch die Projektion vom HVC zum RA ähnlich ausgebildet wie bei den Männchen (Simpson and Vicario 1991b). Nach

bilateraler HVC-Läsion dieser hormonbehandelten Weibchen äußerten diese wieder nur weibchentypische Kontaktrufe (Simpson and Vicario 1991b). Wird die Testosteronbehandlung bei adulten Zebrafinkenweibchen fortgesetzt, beginnen diese sogar zu singen (Gurney 1982; Pohl-Apel and Sossinka 1984; Simpson and Vicario 1991a).

1.5.2. Auswirkungen von Deprivationen

Einen weiteren Ansatz zur Untersuchung von verhaltensbezogenen und neuronanatomischen Veränderungen bei der Gesangsentwicklung von Zebrafinken stellen Deprivationen dar. Diese können mit verschiedenen Untersuchungsansätzen wie Vertäubung, Läsion oder Isolation induziert werden.

- Die Vertäubung stellt eine künstlich herbeigeführte Taubheit der Vögel dar. Taubheit kann durch die operative und beidseitig durchgeführte Entfernung der Cochlea herbeigeführt werden (Konishi 1965b; Nordeen and Nordeen 1992).
- Bei der Läsion werden einzelne Gehirnareale des Gesangssystems durch örtliche Applikation von neurotoxischen Substanzen oder durch Laserstrahlung gezielt zerstört (Simpson and Vicario 1990; Herrmann and Arnold 1991a; Scharff and Nottebohm 1991; Nordeen and Nordeen 1993; Scharff et al. 2000).
- Die Isolation stellt einen vielseitigen Ansatz dar. Hierbei gibt es zahlreiche Möglichkeiten, die Tiere aufzuziehen: beispielsweise durch eine andere Vogelart (Slater 1983; Zann 1985; Riebel et al. 2002), in Abwesenheit adulter Männchen (Eales 1987; Volman and Khanna 1995) oder einzeln in schallisolierten Kammern (Jones et al. 1996).

All diese Deprivationsformen haben bei Zebrafinken Veränderungen in der Gesangsentwicklung zur Folge.

Vertäubung

Versuchsansätze, in denen adulte Zebrafinkenmännchen vertäubt werden, machen deutlich, dass der Gesang adulter Zebrafinkenmännchen doch nicht so unveränderlich ist, wie zunächst angenommen wurde, und offenbar einer auditorischen Rückkopplung bedarf. Diese vertäubten Tiere verändern nach ungefähr ein bis vier Monaten ihren Gesang (Nordeen and Nordeen 1992). Interessant sind in diesem Zusammenhang die Parallelen zwischen dem Gesangserwerb bei Vögeln und dem Spracherwerb beim Menschen (Rehkämper and Zilles 1991; Saito and Maekawa 1993; Doupe and Kuhl 1999; Farries and Perkel 2000; Perkel and Farries 2000). Beispielsweise führt Taubheit sowohl bei Menschen als auch bei Singvögeln zu einer gestörten Sprachbeziehungsweise Gesangsentwicklung, was auf die Notwendigkeit einer auditorischen Rückkopplung schließen lässt (Brainard and Doupe 2000b). Wie lange es dauert, bis sich der Gesang adult vertäubter Zebrafinkenmännchen ändert, ist abhängig vom Alter und der Gesangserfahrung dieser Tiere (Lombardino and Nottebohm 2000). Wird der Vergleich des eigenen Gesangs mit dem erlernten Gesangsmuster nicht durch Vertäubung, sondern durch das Vorspielen von lauten Geräuschen verhindert, können dadurch entstandene Veränderungen im Gesang wieder rückgängig gemacht werden (Leonardo and Konishi 1999). Neuronale Veränderungen nach Vertäubung juveniler Zebrafinkenmännchen sind im Gesangssystem bezüglich der Projektionen vom LMAN zum RA bekannt (Iyengar and Bottjer 2002b). Außerdem ist bei adult vertäubten Männchen eine starke Reduzierung der ZENK Expression im RA beobachtet worden (Whitney and Johnson 2003). ZENK ist ein „Zinkfinger“-Protein, dessen Expression mit Lern- und Gedächtnisprozessen in Zusammenhang steht.

Läsion

Einen konkreten Zusammenhang zwischen morphologischen Strukturen des Gesangssystems und dem Gesangserwerb machen Läsionsversuche deutlich. Läsionen des Gesangsareals LMAN bei juvenilen Zebrafinkenmännchen haben zur Folge, dass diese Tiere keinen normalen arttypischen Gesang erlernen können (Bottjer et al. 1984; Scharff and Nottebohm 1991). Dies trifft auch bei Zebrafinken zu, die zunächst gesangsdepriviert aufgezogen werden und denen erst adult der LMAN läsioniert wird. Auch diese Tiere sind trotz der durch die Aufzuchtbedingungen ausgedehnten sensiblen Phase für den Gesangserwerb nicht in der Lage, arttypischen

Gesang zu erlernen (Morrison and Nottebohm 1993). Diese Ergebnisse weisen auf eine Beteiligung des LMAN am Gesangslernen hin. Die Area-X scheint ebenfalls an der juvenilen Gesangsentwicklung beteiligt zu sein, da deren Läsion bei juvenilen Zebrafinkenmännchen die Gesangsentwicklung stört (Sohrabji et al. 1990). Vergleichende Untersuchungen mit Läsionen der Area-X oder des LMAN bei juvenilen Tieren und anschließende Untersuchungen der Gesangsentwicklung zeigen, dass LMAN läionierte Männchen einen monotonen Gesang äußern, in dem nur ein oder wenige Elemente immer wieder wiederholt werden, während Area-X läionierte Männchen mehrere ungewöhnlich lange Elemente äußern, die sehr variabel sind. In Area-X läionierten Tieren wird, im Gegensatz zu LMAN läionierten Tieren, nie eine Stabilität im Gesang erreicht (Scharff and Nottebohm 1991). Verhaltenstests mit Area-X und LMAN läionierten Tieren zeigen, dass diese Tiere zwar zwischen arteigenem und artfremdem Gesang zu unterscheiden vermögen, ihren eigenen Gesang allerdings nicht erkennen können (Scharff et al. 1998). Weiterhin ist aus Läsionsversuchen die Beteiligung des HVC und des RA an den Kontaktrufen der Zebrafinkenmännchen bekannt. Während HVC und RA-Läsionen bei Zebrafinkenweibchen keinen Einfluss auf die von ihnen geäußerten, angeborenen Kontaktrufe haben, fällt bei Zebrafinkenmännchen der für sie typische erlernte, frequenzmodulierte Teil des Kontakrufes weg (Simpson and Vicario 1990).

Isolation

Aus Versuchen, in denen Zebrafinken durch eine andere Vogelart aufgezogen wurden, oder in denen ihnen während der Entwicklung ein geeigneter Tutor vorenthalten wurde, ist bekannt, dass für das Gesangslernen eine sensible Phase während der Entwicklung existiert (Immelmann 1969; Slater 1983; Eales 1985; Zann 1985; Eales 1987). Diese sensible Phase kann bei mangelndem Angebot eines geeigneten Tutors zeitlich ausgedehnt werden (Eales 1987; Jones et al. 1996). Für Männchen bedeutet das, dass sie im Adultstadium bei Angebot eines entsprechenden Tutors ihren Gesang noch modifizieren können (Eales 1985; Eales 1987; Morrison and Nottebohm 1993; Jones et al. 1996). Wenn Zebrafinkenmännchen durch das Entfernen adulter Männchen gesangsdepriviert aufgezogen werden, dann entwickeln sie einen Gesang, der sich von dem in normalem sozialen Umfeld aufzogener Tiere unterscheidet (Price 1979;

Eales 1985; Jones et al. 1996). Der Gesang, den isoliert aufgezogene Zebrafinkenmännchen entwickeln, unterscheidet sich von dem Gesang sozial aufzogener Männchen hinsichtlich der Frequenz-Zeit-Struktur. Die Strophen dieses „isolierten Gesanges“ sind länger, die Motivlängen sind nicht konstant, die einzelnen Motive bestehen nur aus wenigen Elementen, und diese Elemente weisen andere Charakteristika auf als die eines normalen Zebrafinkengesangs (Eales 1985; Williams and Staples 1992; Morrison and Nottebohm 1993; Volman and Khanna 1995; Jones et al. 1996; Bolhuis et al. 1999). Auf direkte Zusammenhänge zwischen Änderungen im Verhalten und Änderungen in den morphologischen Strukturen des Gesangssystems weisen Vergleiche zwischen sozial und gesangsdepriviert aufgezogenen Zebrafinken hin. Bei gesangsdeprivierten Tieren ist die Dichte der dendritischen Dornen („spines“) in spezifischen Arealen größer als bei sozial aufgezogenen Tieren (Wallhäusser-Franke et al. 1995). Ein Umstand, der nicht in einer Erhöhung der „spine“-Dichten der gesangsdeprivierten Tiere begründet ist, sondern in einer fehlenden Reduktion der „spines“ während der Entwicklung wie es auch in anderen Systemen beobachtet werden kann (Wallhäusser and Scheich 1987; Rollenhagen and Bischof 1991; Wallhäusser-Franke et al. 1995; Bock and Braun 1999). Auch findet sich bei den gesangsdeprivierten Tieren eine verringerte Expression von Proteinen, die an synaptischer Plastizität beteiligt sind, wie beispielsweise der Proteinkinase C (PKC) (Sakaguchi and Yamaguchi 1997).

1.6. Ziel der Arbeit

Grundlage der vorliegenden Arbeit ist die Tatsache, dass sich das Gesangslernen bei Zebrafinken aus zwei Phasen zusammensetzt. In einer wird das arteigene Gesangsmuster als Sollmuster im Gedächtnis abgespeichert. Dies ist ein Prozess, der auch bei Zebrafinkenweibchen stattfindet, obwohl diese nicht singen lernen. In der anderen Phase wird die eigene Vokalisation an das im Gedächtnis gespeicherte Gesangsmuster angepasst. Dieser Prozess findet nur bei Zebrafinkenmännchen statt. Weitere Grundlage ist, dass gesangsdepriviert aufgezogene Zebrafinkenmännchen, im Vergleich zu sozial aufgezogenen Tieren einen veränderten Gesang äußern. Es gibt Evidenzen, welche Gehirnareale und Konnektivitäten an der Gesangsproduktion und welche am Gesangslernen beteiligt sind. Größtenteils unbekannt ist hingegen, welche morphologischen Veränderungen diesen Verhaltensveränderungen zugrunde liegen. Durch den ausgeprägten Sexualdimorphismus in ihrem Gesangsverhalten und durch die Möglichkeit, mit Deprivation ihr Verhalten und ihr neuronales Gesangssystem beeinflussen zu können, bieten Zebrafinken ideale Untersuchungsansätze zur Korrelation von Veränderungen auf Verhaltensebene und auf neuronaler Ebene. Hierzu werden im Rahmen der dargelegten Arbeit folgende Aspekte untersucht:

- Es soll überprüft werden, ob gesangsdeprivierte Aufzucht, die die Gesangsentwicklung von Zebrafinkenmännchen behindert, auch die an der Gesangsproduktion beteiligten Gesangsareale bezüglich ihrer Volumenausbildung und der Ausbildung der Neuronenanzahl, Neuronendichte, Soma- und Nukleusanschnittsflächen innerhalb dieser Areale beeinflusst.
- Weiter soll untersucht werden, ob die Verbindungen der AFP bei Zebrafinkenweibchen gleichermaßen ausgebildet sind wie bei Zebrafinkenmännchen.
- Vergleichende Untersuchungen zwischen sozial aufgezogenen Zebrafinkenmännchen und -weibchen sollen zeigen, ob es in den Gesangsarealen der AFP morphologische Übereinstimmungen bezüglich der Ausbildung der Gesangsarealvolumen und der Neuronenanzahl, Neuronendichte, Soma- und Nukleusanschnittsflächen innerhalb dieser Areale gibt. Solche Übereinstimmungen könnten Hinweise geben auf Ort und Art der Niederlegung des arteigenen Gesangsmusters, die sowohl bei Männchen als auch bei Weibchen stattfindet.

Einzelne Aspekte davon sind zwar bereits untersucht, doch ein systematischer durchgehender Vergleich fehlt bislang.

- Es soll überprüft werden, ob gesangsdeprivierte Aufzucht bei Zebrafinkenweibchen morphologische Veränderungen in der Ausbildung der AFP bewirkt (Verbindungen der zur AFP gezählten Gesangsareale; deren Volumina und die Neuronenanzahl, Neuronendichte, Soma- und Nukleusanschnittsflächen innerhalb dieser Areale). Da Zebrafinkenweibchen lediglich angeborene Kontaktrufe äußern, an deren Produktion diese Gesangsareale nicht beteiligt sind, könnten deprivationsbedingte Veränderungen Hinweise auf Ort und Art der Speicherung des art eigenen Gesangsmusters geben.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Versuchstiere

2.1.1. Systematik

Die Untersuchungen zu Lern- und Gedächtnisprozessen wurden am Gesangssystem von Zebrafinken durchgeführt. Es wurden Nachzuchten vom australischen Wildtyp verwendet. Der australische Zebrafink (*Taeniopygia guttata* (Abbildung 6)) wird der Familie der Prachtfinken (*Estrildidae*) zugeordnet, welche der Unterordnung der Singvögel (*Oscines*) innerhalb der Ordnung der Sperlingsvögel (*Passeriformes*) angehören.



Abb. 6: Zebrafinkenpaar; links: Männchen, rechts: Weibchen (Grzimek 1980).

2.1.2. Herkunft, Aufzucht, Haltung

Die Fragestellungen wurden an adulten, gesangsdepriviert und sozial aufgezogenen Männchen und Weibchen untersucht. Die sozial aufgezogenen Tiere wurden in einer Flugvoliere von 186 x 86 x 62 cm gehalten. Zur Nachzucht wurde jeweils ein Zebrafinkenpaar in einem Käfig von 28 x 40 x 51 cm gehalten. Wenn die Brut 100 Tage alt und somit adult war, wurde sie in die Flugvoliere gesetzt. Um ausreichend genetischen Austausch zu gewährleisten, wurde die eigene Nachzucht der Abteilung durch Tiere von der Firma JOKO Zoomarkt (Bramstedt / Bassum) ergänzt.

Die Gesangsdeprivation erfolgte nach einer üblichen Methode (Wallhäusser-Franke et al. 1995; Basham et al. 1996). Von einem Brutpaar wurde fünf Tage nach dem Schlupf der Jungtiere der Vater aus dem Aufzucht-Käfig entfernt, so dass die Jungtiere nur von

der Mutter aufgezogen wurden. Die Tiere konnten keinen adulten männlichen Zebrafinken hören oder sehen. Die Tiere beider Aufzuchtgruppen wurden in einem Tag-Nacht Rhythmus von 14:10 Stunden mit Futter und Wasser *ad libitum* gehalten.

2.2. Gesangsaufnahmen und Sonagramme

Lautäußerungen adulter Tiere (sozial und gesangsdepriviert aufgezogener Männchen und Weibchen) wurden aufgezeichnet, und von diesen akustischen Aufnahmen wurden Sonagramme erstellt (siehe Abschnitt 2.2.3.: Abbildung 7, 8). Für die Tonaufnahmen wurde das jeweilige Tier in einen separaten Käfig gesetzt, der akustisch von den anderen Tieren getrennt war. Ein Mikrofon wurde etwa zehn Zentimeter vor dem Käfig aufgestellt. Es wurde ein Kondensormikrofon (ECM-959; Sony®) verwendet. Die Lautaufnahmen wurden auf einem digitalen Aufzeichnungsgerät (DAT-Recorder; TCD 08; Sony®) aufgezeichnet. Die Aufnahmen erfolgten in einem Frequenzbereich von 50 - 18 000 Hz. Die digitalisierten Gesangsaufnahmen der verschiedenen Untersuchungsgruppen wurden auf einen Computer überspielt. Mit Hilfe eines für Vogelgesangsanalysen entwickelten Programms (Canary 1.2.) wurden aus den digitalisierten Daten Zeit-Frequenz-Diagramme (Sonagramme) erstellt. Die Sonagramme wurden mit einer „fast fourier transformation“ (FFT) von 256 Punkten erstellt. Für die Sonagramme ergibt sich bei einem Frequenzbereich von 11 kHz eine Frequenzauflösung von 86,13 Hz und eine Zeitauflösung von 5,80 ms.

2.2.1. Lautäußerungen sozial und gesangsdepriviert aufgezogener Tiere

Der Gesang adulter gesangsdepriviert aufgezogener Zebrafinkenmännchen unterscheidet sich von dem adulter sozial aufgezogener Zebrafinkenmännchen (Abbildung 7). Die Strophen gesangsdepriviert aufgezogener Männchen enthalten weniger Einleitungselemente als die Strophen sozial aufgezogener Männchen und die Länge der Pausen zwischen den Einleitungselementen unterscheidet sich bei gesangsdepriviert aufgezogenen Männchen von denen der sozial aufgezogenen Männchen (Nixdorf-Bergweiler et al. 1999b). Auch die einzelnen Motive setzten sich

aus weniger Elementen zusammen, die Strophen sind tendenziell länger als bei sozial aufgezogenen Männchen, wie anderweitig schon beschrieben wurde (Eales 1985; Morrison and Nottebohm 1993).

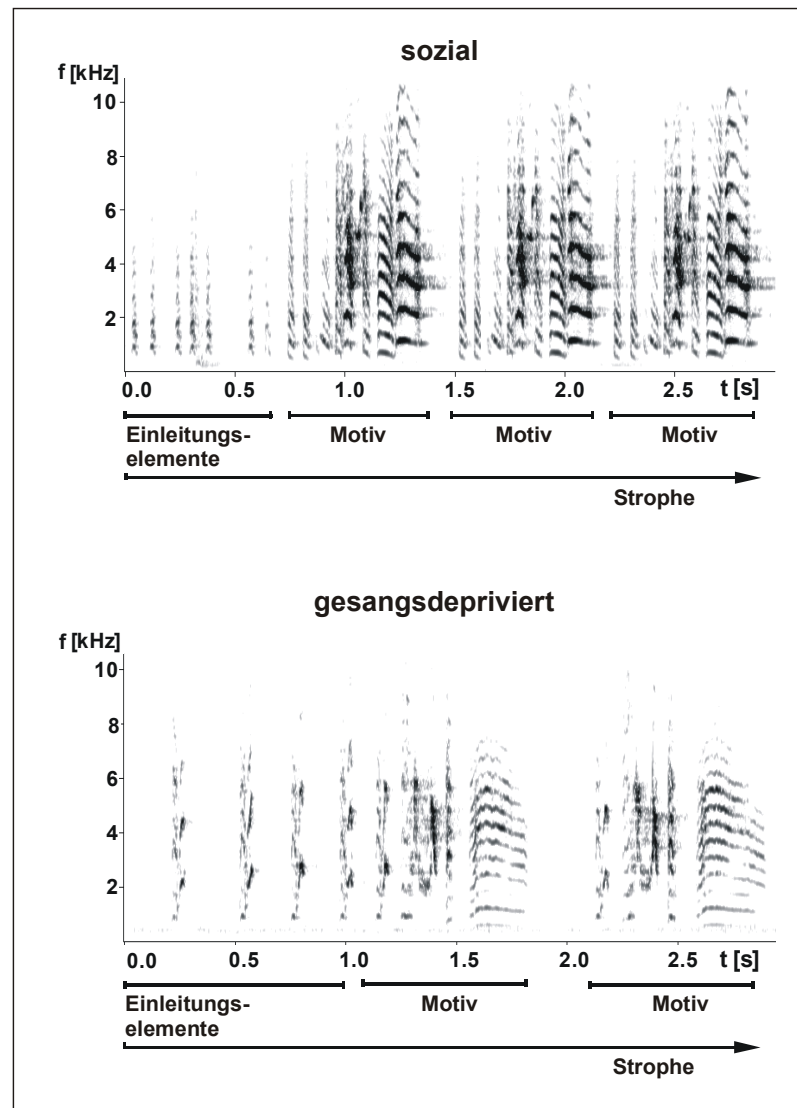


Abb. 7: Oben: Sonogramm einer Strophe aus dem Gesang eines adulten sozial aufgezogenen Zebrafinkenmännchens; unten: Sonogramm einer Strophe aus dem Gesang eines adulten gesangsdepriviert aufgezogenen Zebrafinkenmännchens (modifiziert nach Nixdorf-Bergweiler et al. 1999a).

Abkürzungen: f: Frequenz, kHz: Kilohertz, t: Zeit, s: Sekunden

Bei der Vokalisation der Weibchen konnte zwischen gesangsdepriviert aufgezogenen und sozial aufgezogenen Tieren kein Unterschied festgestellt werden (Abbildung 8). In beiden Gruppen waren die Kontaktrufe kurz und wurden von den einzelnen Tieren immer gleichartig geäußert. Die Kontaktrufe waren weder bei gesangsdepriviert noch

bei sozial aufgezogenen Weibchen frequenzmoduliert, wie es für die Kontaktrufe der Zebrafinkenmännchen typisch ist, da sie bei Weibchen angeboren sind (Simpson and Vicario 1990).

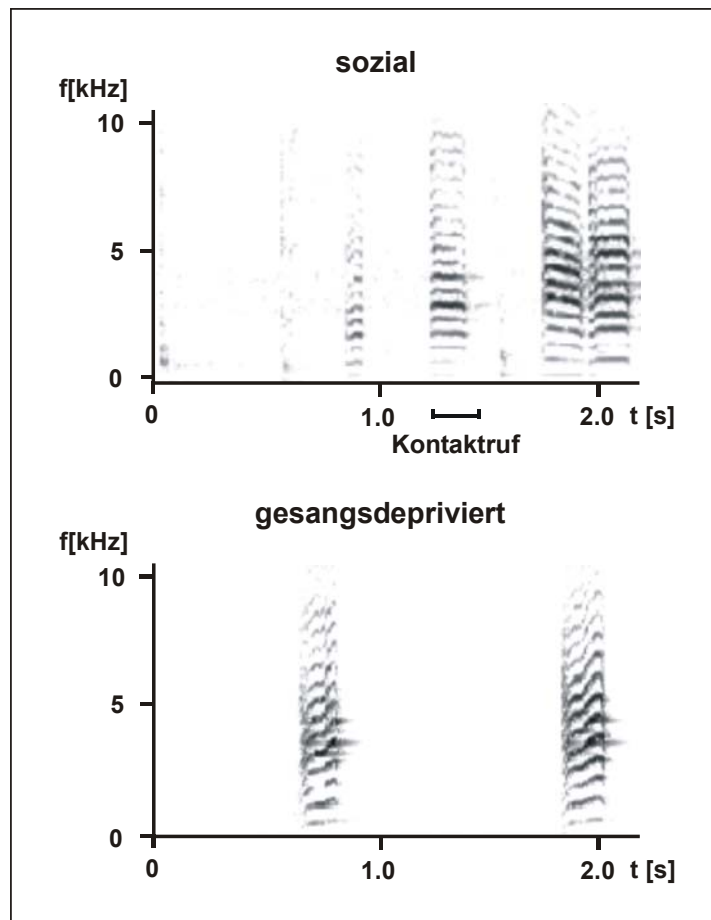


Abb. 8: Vergleich der Sonagramme eines Kontaktrufs eines adulten sozial (oben) und eines gesangsdepriviert (unten) aufgezogenen Zebrafinkenweibchens. Die Kontaktrufe der beiden unterschiedlich aufgezogenen Zebrafinkenweibchen unterscheiden sich nicht (Abkürzungen: f: Frequenz, kHz: Kilohertz, t: Zeit, s: Sekunden).

2.3. Methoden der Fasermarkierungsstudie

Die Untersuchungen zu Faserverbindungen innerhalb der AFP wurden an sieben sozial aufgezogenen adulten Männchen und an acht sozial- und zwei gesangsdepriviert aufgezogenen adulten Weibchen durchgeführt. Die Tiere bekamen *in vivo* fluoreszente Marker („Tracer“) appliziert (Tabelle 2), die einige Tage im lebenden Tier transportiert wurden. Die Markierung von Faserverbindungen wurde anhand von Gehirnschnittpräparaten am Fluoreszenzmikroskop untersucht.

Gesangsareale	Injektionen		
	M.soz. (N = 7)	W.soz. (N = 8)	W.depr. (N = 2)
HVC	n = 5 (N = 3)	n = 1 (N = 1)	-
DLM	n = 6 (N = 3)	n = 6 (N = 3)	n = 2 (N = 1)
LMAN	n = 7 (N = 4)	n = 15 (N = 8)	n = 3 (N = 2)
RA	n = 2 (N = 2)	-	n = 1 (N = 1)

Tab. 2: Tabellarische Übersicht zur Anzahl der *in vivo* Injektionen in die Gesangsareale HVC, DLM, LMAN und RA bei sozial aufgezogenen Männchen (M.soz.), sozial aufgezogenen Weibchen (W.soz.) und gesangsdepriviert aufgezogenen Weibchen (W.depr.); Abkürzungen: N = Anzahl der Tiere pro Gruppe; n = Anzahl der Injektionen pro Gehirnareal innerhalb einer Gruppe.

Als Marker von Faserverbindungen dienten die mit Fluoreszenzmolekülen gekoppelten Dextranamine Rhodamin-Dextranamin (RDA: Absorptionsmaximum: 541 nm, Emissionsmaximum: 572 nm, Lysin-gekoppelt; Molecular Probes Inc. USA) und Fluorescein-Dextranamin (FDA: Absorptionsmaximum: 491 nm, Emissionsmaximum: 518 nm, Lysin-gekoppelt; Molecular Probes Inc. USA). Beide Farbstoffe haben ein Molekulargewicht von 10 000. Die Farbstoffe wurden in kleinen Aliquots gelöst (siehe 6.2.), bei –18 °C tiefgefroren und lichtgeschützt aufbewahrt. Für die Applikation des Farbstoffes wurden mit Hilfe eines horizontalen Elektrodenziehgerätes (Micropipette-Puller P-97; Sutter Instruments) Glaskapillaren mit Öffnungen von etwa 0,2 µm hergestellt. Diese Glaskapillaren wurden mit Hilfe eines Nanoliterinjektors (World Precision Instruments) mit dem jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff gefüllt.

Für die Applikation der fluoreszenten Marker wurden die Tiere durch eine Equithesin-Injektion (siehe 6.2.) in den Brustmuskel betäubt und in einem stereotaktischen Kopfhalter fixiert. Anschließend wurden die Kopffedern entfernt. Somit konnte man die Stelle, an der beide Hemisphären und das Cerebellum aneinander grenzen, durch die Schädeldecke erkennen. Da diese Stelle aussieht wie ein auf dem Kopf stehendes Y, wird sie üblicherweise in Gehirnatlantanten als „Y-point“ bezeichnet. Dieser Punkt dient als Null-Koordinate. Von ihm ausgehend wurden die Koordinaten für die Gehirnregionen abgemessen und bestimmt. Als Grundlage zur Bestimmung der Koordinaten dienten persönliche Aufzeichnungen, die mir freundlicherweise von B. E. Nixdorf-Bergweiler zur Verfügung gestellt wurden. An den jeweiligen Koordinaten wurde mit einer Pinzette ein kleines Loch in die Schädeldecke präpariert. Mit Hilfe eines Mikromanipulators konnte die mit Farbstoff gefüllte Kanüle in der x-, y- und z-Ebene mit einer Feinststeuerung im Mikrometer-Bereich genau positioniert werden. Die Menge des applizierten Farbstoffs konnte mittels des Nanoliterinjektors genau dosiert werden (zwischen 13-27 Nanolitern). Nachdem der „Tracer“ drei bis vier Tage im lebenden Tier transportiert worden war, wurde dieses mit Nembutal betäubt und, wie in Abschnitt 2.4.1. beschrieben, perfundiert. Als Fixativ wurde 4 % Paraformaldehyd in 0,125 M Phosphatpuffer (siehe 6.2.) benutzt. Die herauspräparierten Gehirne wurden im Fixativ bei 4 °C aufbewahrt und später für die Gefrierschnitttechnik aufgearbeitet.

2.3.1. Anfertigung von Gefrierschnitten

Für die Anfertigung von Gefrierschnitten wurden die im Fixativ aufbewahrten Gehirne zunächst für einige Stunden in eine bei 4 °C gekühlte 15 %ige Saccharose / Fixativ-Lösung (siehe 6.2.) überführt und anschließend in einer 30 %igen Saccharose / Fixativ-Lösung (siehe 6.2.) ebenfalls bei 4 °C aufbewahrt. Die Gehirne verblieben so lange in der jeweiligen Lösung, bis sie von dieser vollständig durchdrungen waren, was durch das Absinken des Gehirns auf den Boden erkennbar war. Diese Schritte dienen neben einer leichten Postfixierung auch dazu, ein Platzen der Zellen durch Kristallbildung während des Gefrierens beim nachfolgenden Gefrierschneiden zu verhindern. Die Gefrierschnitte wurden an einem Mikrotom (Jung RM2035; Leica), das mit einer

mobilen Gefriereinrichtung (Frigomobil; Jung RM2035; Leica) kombiniert war, angefertigt. Hierzu wurde der Schnittblock auf $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Um das Präparat auf dem Schnittblock zu fixieren und ein vollständiges Schneiden ohne Verlust der Anschnittsfläche zu ermöglichen, wurde auf dem Schnittblock ein kleiner Podest aus „Tissue-Tek“ (Miles) angefertigt, der am Mikrotom plan geschnitten wurde. Das postfixierte Gehirn wurde durch einen Schnitt in die zwei Hemisphären getrennt. Eine Gehirnhälfte wurde wieder in der 30 %igen Saccharose / Fixierlösung aufbewahrt, die andere Hemisphäre wurde auf dem Podest aufgefroren und durch Übersichtung mit „Tissue-Tek“ eingebettet. Die eingebettete Hirnhälfte wurde für 30 Minuten bei $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ auf- und durchgefroren. Im Anschluss wurden am Mikrotom mit einem Messerwinkel von 6 ° bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ $30\text{ }\mu\text{m}$ dicke Gefrierschnitte angefertigt. Die Serienschnitte wurden lichtgeschützt in mit Phosphatpuffer gefüllten Gewebekulturplatten gesammelt, um ein Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes zu verhindern.

Die Schnitte wurden alternierend in drei Serien aufgeteilt, auf gelatinisierte Objektträger (siehe 6.2.) aufgezogen und luftgetrocknet. Eine Serie wurde einer Nissl-Färbung (siehe 6.2.) unterzogen und mit dem Einbettmedium Merckoglas (Merck) eingedeckelt. Die beiden anderen Serien wurden für nachfolgende fluoreszenzmikroskopische Analysen mit „Fluoromont“ (Serva) eingedeckelt. Bei der anschließenden Analyse der Fluoreszenzschnittpräparate konnten im Fluoreszenzmikroskop beobachtete Injektionsstellen, beziehungsweise gefärbte Zellen und Fasern durch den Vergleich mit den korrespondierenden Nissl-gefärbten Schnitten am Lichtmikroskop die Lage der beobachteten Fluoreszenzfärbungen im Gehirn bestimmt werden.

2.3.2. Auswertung und Dokumentation der Fluoreszenzpräparate

Die fluoreszenzmarkierten Schnittpräparatserien wurden an einem Fluoreszenzmikroskop (AHBT3 Research Photomicrographic Microscope System mit AH3-RFC Reflected Light Fluorescence Attachment; Olympus) fotografiert. An das Mikroskop war eine Videokamera (CCD-Kamera, Photonic Science Cool ColourView 3) angeschlossen, welche dazu benutzt wurde, digitalisierte Bilder in den Computer einzulesen. Mit Hilfe dieses Systems und unter Verwendung der Software Image Pro Plus (Image-Pro® Plus, Version 1.3 for Windows, Media Cybernetics) wurden digitale Bilder der Fluoreszenz-Präparate erstellt.

2.4. Methoden der morphometrischen Studie

Die morphometrischen Untersuchungen wurden an zwölf sozial und sieben gesangsdepriviert aufgezogenen Männchen und an sieben sozial und sieben gesangsdepriviert aufgezogenen Weibchen durchgeführt. Aus der Gruppe der sozial aufgezogenen Tiere war von fünf Männchen und vier Weibchen Schnittmaterial bereits vorhanden.

2.4.1. Betäubung, Perfusion und Gehirnentnahme

Die Betäubung der Tiere erfolgte durch eine intramuskuläre Injektion von 0,03 ml reinem Nembutal (Sanofi CEVA) in die Brustmuskulatur. Anschließend wurden die Tiere über die linke Herzkammer wie folgt perfundiert: Zuerst wurde zwei Minuten mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9 %) perfundiert, um blutfreies Gewebe zu erhalten. Danach wurde für 15 - 20 Minuten mit einem 3 %igem Glutardialdehyd- / Paraformaldehyd-Gemisch, dem zur besseren Konservierung der Membranen CaCl_2 zugesetzt worden war ((Karnovsky 1965); siehe 6.2.), perfundiert, um eine vollständige Fixierung des Gewebes zu gewährleisten. Nach der Perfusion wurden die Tiere für etwa zwei Stunden bei 4 °C aufbewahrt, um die Entstehung von „*post mortem Zellen*“ zu

verhindern (Cammermeyer 1978). Anschließend wurden die Gehirne herauspräpariert und in Fixativ bei 4 °C gelagert (3 %iges Glutardialdehyd / Paraformaldehyd-Gemisch; siehe 6.2.).

2.4.2. Anfertigung von Vibratomschnitten

Von den fixierten Gehirnen wurden an einem Vibratom (Leica VT 1000 E) 100 µm dicke Sagittalschnitte angefertigt. Hierfür wurden die Gehirne zunächst entlang der Medianfurche halbiert und mit der Schnittfläche mittels Cyanoacrykleber (Uhu®) auf einer Halterung befestigt. Die Präparate wurden in 0,1 M Natriumcacodylatpuffer (siehe 6.2.) geschnitten und in mit Natriumcacodylatpuffer gefüllten Gewebekulturplatten gesammelt. Für eine bessere Identifizierung der Kernregionen wurden die Schnitte mit einer Methylenblau-Toluidinblau-Färbelösung (siehe 6.2.) gefärbt, indem dem Puffer ein bis drei Tropfen der Färbelösung zugesetzt wurden.

2.4.2.1. Volumenbestimmung

Zur Volumenbestimmung der Gesangsareale wurden zunächst an einem Lichtmikroskop (Axioskop; Zeiss), das mit einem Zeichentubus ausgestattet war, die Umrisse der Areale abgezeichnet (Abbildung 9). Diese „*Camera-Lucida*“-Zeichnungen wurden mit Hilfe eines grafischen Tablett (Summa Sketch III Professional; Summagraphics) in einen Computer eingelesen und so die jeweiligen Anschnittsflächen bestimmt. Zur Berechnung der Gesangsarealvolumina wurden alle Flächen eines Areals addiert und mit der Schnittdicke multipliziert.

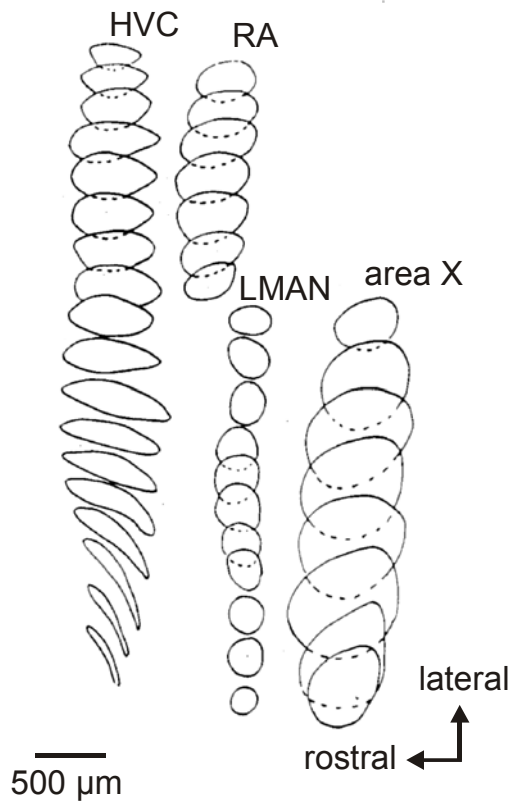


Abb. 9: Umrisszeichnungen der Anschnittflächen der Gesangsareale HVC, RA, LMAN und Area-X bei einem 60 Tage alten Zebrafinkenmännchen; links: rostral, oben: lateral (Nixdorf-Bergweiler 1996).

2.4.3. Anfertigung von Semidünnschnitten

Aus den Vibratomschnitten, an denen zuvor die Volumenbestimmung der Gesangsareale vorgenommen worden war (siehe 2.4.2.1.), wurden im Anschluss die Gesangsareale mit einer speziellen Rasierklinge herausgeschnitten. Diese Gewebeproben erhielten eine Markierung, anhand derer immer die ursprüngliche Orientierung des Gesangsareals im Gehirn nachvollzogen werden konnte (Abbildung 10).

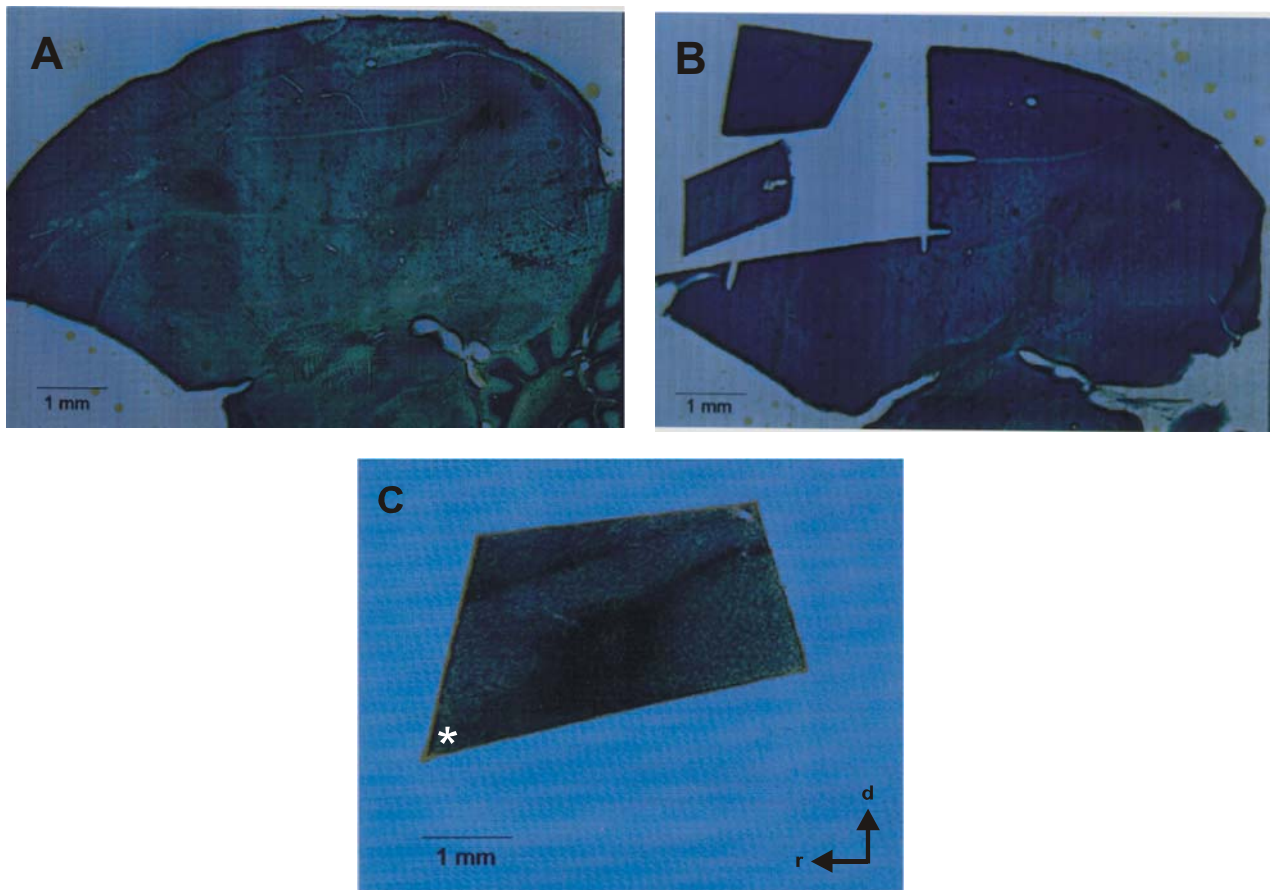


Abb.10: Abbildung zur Veranschaulichung der Vorgehensweise zur Anfertigung von Semidünnschnittpräparaten. Gezeigt wird die Lokalisation und das Herausschneiden einer Gewebeprobe mit dem Gesangsareal aus einem Vibratomschnittpräparat.

A: Nissl-gefärbter Vibratomschnitt (sagittal, 100 µm) eines adulten Zebrafinkenmännchens;

B: Vibratomschnitt nach Heraustrennen des LMAN;

C: ausgeschnittener LMAN; die Ecke mit dem spitzen Winkel diente als Markierung (*)

(d: dorsal, r: rostral).

Die Vibratomschnitte mit den ausgeschnittenen Gehirnregionen und alle übrigen Vibratomschnitte wurden auf gelatinisierte Objektträger (siehe 6.2.) aufgezogen und mit dem Einbettmedium „Merckoglas“ (Merck) eingedeckelt.

Die ausgeschnittenen Gewebeproben der Gesangsareale wurden nachkontrastiert und in Kunstharz (Epon) eingebettet, um Semidünnschnitte anzufertigen. Zur

Nachkontrastierung wurden die Gewebeproben zweimal für 15 Minuten in 0,1 M Natriumcacodylatpuffer gewaschen und anschließend für zwei Stunden in einer 1 %igen Osmiumtetroxid (OsO_4) Lösung bei 4 °C aufbewahrt (siehe 6.2.). Nach dieser Nachkontrastierung, die zudem eine leichte Postfixierung des Gewebes bedingt, wurden die Gewebeproben dreimal zehn Minuten in Puffer gewaschen und in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Dazu wurden die Gewebeproben fünf Minuten in 30 %igem, fünf Minuten in 50 %igem, 45 Minuten in 70 %igem, 30 Minuten in 90 %igem und dreimal 20 Minuten in 100 %igem Methanol gewaschen. Nach dem letzten Dehydrierungsschritt wurden die Proben zweimal 15 Minuten eisgekühltem Propylenoxid ausgesetzt und anschließend über Nacht mit einer 1:1 Mischung Propylenoxid / Epon (siehe 6.2.) infiltriert. Dadurch wurden die Präparate mit dem Kunstharz durchtränkt und gefestigt. Um die Gewebeproben in definierter Orientierung einzubetten, wurden sie einer Flacheinbettung unterzogen. Hierzu wurden die mit Kunstharzgemisch durchtränkten Gewebeproben aus dem Propylen / Epon-Gemisch gesammelt und jeweils mit einem Tropfen Epon auf Alufolie überführt und mit einer Spezialfolie (Melinex; L4103; Acar Scientific LTD) abgedeckt. Die Proben wurden über Nacht im Wärmeschränk zur Auspolymerisierung bei 60 °C inkubiert. Am folgenden Tag konnten die Gewebeproben, die nun an den Spezialfolien hafteten, von der Alufolie abgezogen werden. Die an der Spezialfolie haftenden Gewebeproben wurden mit einem Tropfen Epon auf zuvor hergestellte zylindrische Blöckchen aus Epon aufgeklebt. Die Blöckchen mit den Gewebeproben wurden zur Auspolymerisation des Kunstharzes bei 60 °C über Nacht im Wärmeschränk aufbewahrt. Im Anschluss daran konnte die noch am Präparat verbliebene Spezialfolie abgezogen werden.

Die säulenförmigen Kunstharzblöckchen wurden konisch zurechtgetrimmt, sodass die Gewebeprobe frei lag. Die Semidünnschnitte (1 μm) wurden an einem Ultramikrotom (Reichert-Jung) mit Glasmessern, die an einem Messerbrechgerät (LKB) hergestellt worden waren, angefertigt. Die erhaltenen Semidünnschnitte wurden jeweils in einem Wassertropfen auf gelatinebeschichteten Glasobjektträgern gesammelt, getrocknet und mit einer Methylenblaufärbelösung (2 C 180; Merck) nachkontrastiert. Nach dem Trocknen bei 40 °C auf der Heizplatte wurden die Semidünnschnitte mit dem Einbettmedium „Merckoglas“ (Merck) eingedeckelt. An Semidünnschnitten der Hirnareale HVC, LMAN und RA wurden sowohl Soma- und Nukleusanschnittsflächen als auch die Neuronendichte der jeweiligen Hirnareale bestimmt.

2.4.3.1. Bestimmung der Soma- und Nukleusanschnittsflächen

Von den Gesangsarealen HVC, LMAN und RA wurden aus allen Untersuchungsgruppen anhand der Semidünnschnitte am Lichtmikroskop (Axioskop; Zeiss) die Anschnittsflächen der Somata und Nuklei untersucht. Das Lichtmikroskop war mit dem Neurolucida-System (MicroBrightField Version 2.0) gekoppelt. Dieses System ermöglicht es beim Blick durch das Mikroskop, sowohl das Präparat als auch den eingblendeten Computermonitor zu sehen (Abbildung 11). Mit Hilfe eines grafischen Tablettts ist das genaue Abzeichnen der Umrissse von Somata und Nuklei möglich. Es wurden jeweils 50 Zellen pro Tier und Gesangsareal ausgemessen. Um bei allen gemessenen Zellen möglichst die gleiche Schnittebene für die Flächenberechnung heranzuziehen, wurden nur Zellen, in denen der Nukleolus sichtbar war, ausgewertet.

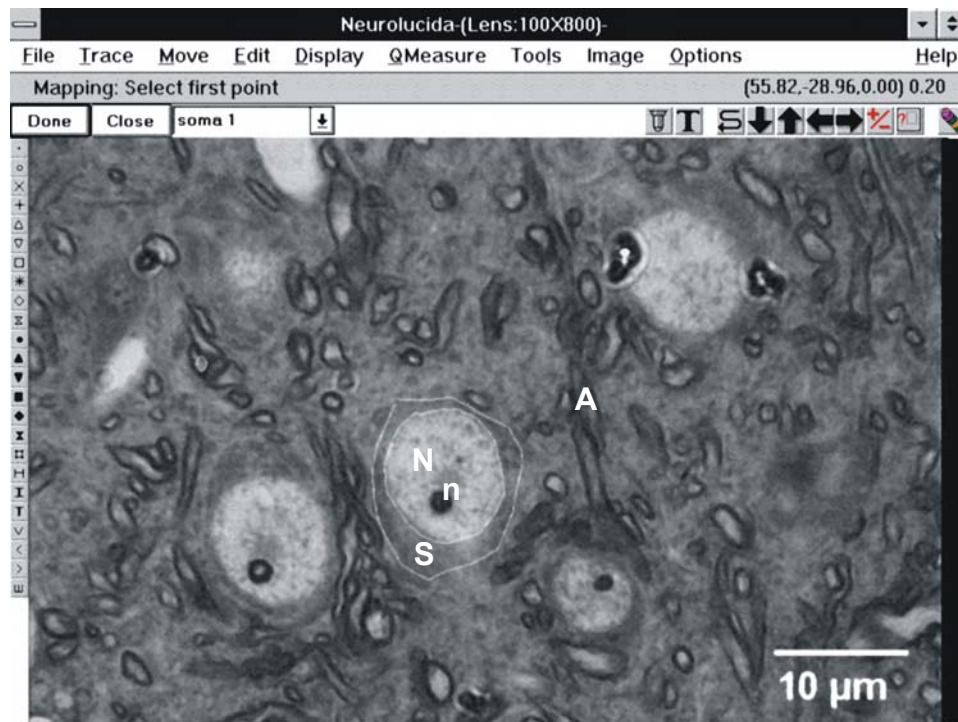


Abb. 11: Soma- und Nukleusanschnittsflächenmessung; die Abbildung zeigt eine Bildschirmkopie der Neurolucida-Software mit eingeblendetem Videobild des Mikroskops. Die weißen Linien markieren die Umrisse vom Soma und Nukleus einer Nervenzelle im LMAN eines adulten sozial aufgezogenen Männchens (Semidünnschnitt: 1µm; Abkürzungen: S: Soma, N: Nukleus, n: Nukleolus, A: angeschnittenes Axon mit Myelinhülle).

2.4.3.2. Bestimmung der Neuronendichte und der Neuronenanzahl

Zur Bestimmung der Neuronendichte wurden die selben Schnittpräparate wie für die Somata- und Nuklei-Größenbestimmung verwendet. Die Analyse der Neuronendichte und die Berechnung der Neuronenanzahl pro Gehirnareal erfolgte mittels der physikalischen Disector-Technik nach Coggeshall (Coggeshall 1992; Coggeshall and Lekan 1996). Diese Technik basiert auf der ursprünglich von Sterio (Sterio 1984) beschriebenen Disector-Technik. Nach dieser Methode werden in einem bestimmten Volumen Objekte gezählt, die in einem Schnitt (Referenzschnitt) zu sehen sind, im anderen Schnitt (sogenannten „look-up“ Schnitt) jedoch nicht. Hierfür wird ein ganz bestimmtes Objekt aus dem Referenz-Schnitt gewählt und dann überprüft, ob genau dieses gleiche Objekt im „look-up“ Schnitt zu sehen ist. Ist das Objekt in einem Schnitt

zu sehen, im anderen jedoch nicht, wird es gezählt. Die so gezählten Objekte werden als „top“ (Q) bezeichnet. Des Weiteren wird die untersuchte Fläche im Referenzschnitt (a_{Dis}) bestimmt und die Höhe (h) jedes Disectors gemessen.

Das Volumen des Disectors (V_{Dis}) wird nach folgender Formel bestimmt:

$$V_{Dis} = h * a_{Dis}.$$

Die Berechnung der Objektanzahl in dem Disector-Volumen erfolgt nach:

$$N_V = \sum Q_i / \sum V_{dis}.$$

N_V , die numerische Neuronendichte, ist die Neuronenanzahl pro Volumeneinheit. $\sum Q_i$ ist die Summe aller gezählten „tops“. $\sum V_{dis}$ ist die Summe der Disectorvolumen.

Die totale Neuronenanzahl (N) lässt sich nach folgender Formel berechnen:

$$N = V_{Ref} * N_V.$$

Dabei ist N_V die Neuronenanzahl pro Volumeneinheit. V_{Ref} ist das entsprechende Referenzvolumen eines Hirnareals, welches zuvor, wie in 2.4.2.1 beschrieben, bestimmt wurde.

In dieser Studie wurden zur Bestimmung der Neuronendichte Nukleoli als „tops“ gewählt. Ihr Durchmesser beträgt etwa ein bis zwei Mikrometer. Die untersuchten Schnittpräparate waren ein Mikrometer dicke Seriensemiddünnschnitte. Von zwei benachbarten Schnitten (einem Disector-Paar) wurden nur die Zellen gezählt, bei denen im einen Schnitt der Nukleolus einer Zelle deutlich zu sehen war und von dieser Zelle im Nachbarschnitt der Nukleolus nicht zu sehen war. Pro Hirnareal und Tier wurden je vier Disector-Paare ausgewertet, nachdem in einer Pilotstudie ermittelt worden war, dass bei dieser Anzahl von Disector-Paaren der Fehlerkoeffizient (CE) kleiner war als die biologische Varianz (BV).

Die Untersuchungsfläche pro Disector richtete sich nach der Größe des Gesangsareals und der Neuronengröße. Im LMAN der Weibchen und im HVC von Weibchen und Männchen betrug die Untersuchungsfläche des Disectors $4356 \times 4356 \mu m^2$. Im LMAN der Männchen und im RA beider Geschlechter betrug die Untersuchungsfläche pro Disector $18360 \times 18360 \mu m^2$. Die Zelldichte im jeweiligen Messareal wurde, wie oben beschrieben, bestimmt, und für alle Gehirnareale wurde die numerische Dichte pro $100000 \mu m^3$ berechnet.

Die Zellzählung wurde computergestützt an digitalen Bildern der Schnittpräparate durchgeführt. Hierfür wurden zunächst mit Hilfe einer Videokamera digitale Bilder der benachbarten Schnitte erzeugt, die genau den gleichen Ausschnitt zeigten. Zur Analyse

wurde das Programm Image Pro Plus (Image-Pro© Plus, Version 1.3 for Windows, Media Cybernetics) verwendet. Die Zellen, in denen ein Nukleolus in einem digitalisierten Bild eines Semidünnschnitts zu sehen war, im digitalisierten Bild des darauffolgenden (Nachbar-) Semidünnschnitts jedoch nicht, wurden markiert (Abbildung 12) und gezählt.

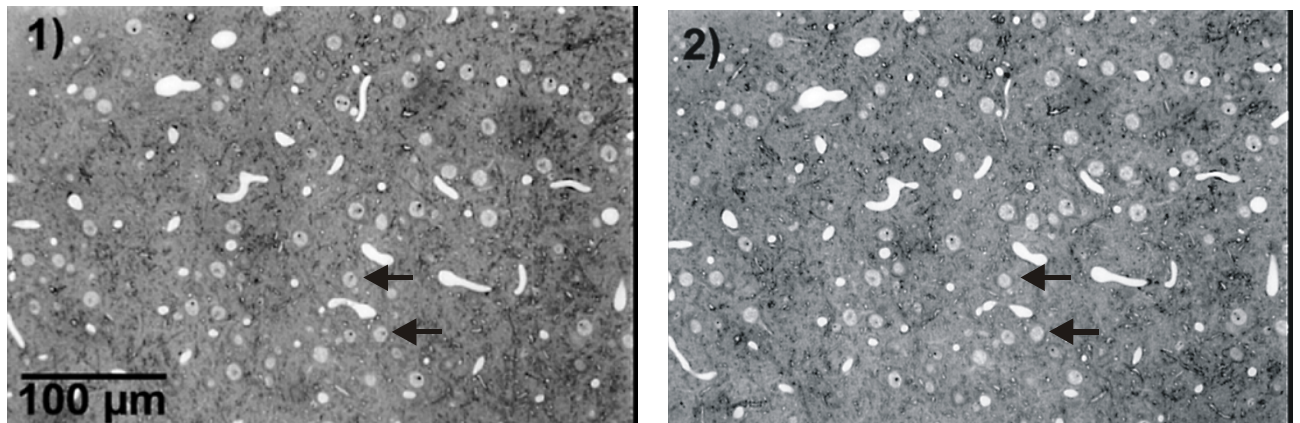


Abb. 12: Die Abbildung zeigt lichtmikroskopisch erzeugte und digitalisierte Bilder eines Disektoren-Paares; exemplarisch sind zwei Zellen durch Pfeile markiert, die im Referenzschnitt (1) einen Nukleolus zeigen, im „look-up“ Schnitt (2) jedoch nicht.

Daran anschließend wurde nach der Vorgehensweise der Disector-Technik die numerische Neuronendichte (N_V) bestimmt. Mit den Daten, die mit Hilfe der Volumenbestimmung erhoben wurden, konnte für die diversen Hirnkerne der verschiedenen Zebrafinkengruppen die gesamte Neuronenanzahl der jeweiligen Struktur berechnet werden, da die Disector-Technik keine konstante Neuronendichte im Volumen voraussetzt (Sterio 1984; West 1993; Hedreen 1998a; West 1999).

Im Detail wurde mit Hilfe dieser Technik die Neuronendichte und die Neuronenanzahl der Gesangsareale HVC, LMAN und RA bei sozial und gesangsdepriviert aufgezogenen Männchen und Weibchen bestimmt.

2.4.4. Auswertung der morphometrischen Studien

Für die jeweiligen Untersuchungsparameter wurden für jede Gruppe und jedes Hirnareal die Mittelwerte und die Standardabweichung berechnet. Der t-Test oder das

„general linear model“ (GLM) wurden benutzt, um zu prüfen, ob zwischen den untersuchten Gruppen signifikante Unterschiede bezüglich eines untersuchten Parameters in den einzelnen Hirnarealen auftraten. Bei einem Vergleich zwischen zwei Gruppen wurde der t-Test verwendet, wenn mehrere Gruppen untereinander verglichen wurden, wurde das GLM benutzt. Als Signifikanzniveau wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ angenommen. Die statistischen Berechnungen und Analysen erfolgten mit den Statistikprogrammen SAS (SAS; Germany) und Prism 3.0 (Graph Pad Inc.; USA). Bei der grafischen Darstellung der Daten wurde der Mittelwert (MW) \pm die Standardabweichung (STD) der Mittelwerte dargestellt.

3. ERGEBNISSE

Bei Zebrafinkenweibchen wurden die Projektionen zwischen den einzelnen Gehirnarealen der AFP untersucht, um überprüfen zu können, ob die Verbindungen der AFP bei Zebrafinkenweibchen ähnlich ausgebildet sind wie bei Zebrafinkenmännchen. Außerdem wurden in beiden Geschlechtern die Gesangsareale der AFP bezüglich ihrer Volumenausbildung untersucht und die Anzahl, Dichte und Größe der Neurone und deren Zellkerne innerhalb dieser Gesangsareale bestimmt. Diese Untersuchungsparameter wurden zum einen zwischen den Geschlechtern verglichen, zum anderen wurde untersucht, ob gesangsdeprivierte Aufzucht Auswirkungen auf diese Untersuchungsparameter hat.

Im Folgenden werden in Abschnitt 3.1. die Ergebnisse der Untersuchungen bezüglich der Projektionen zwischen den Gesangsarealen der AFP dargestellt, und in Abschnitt 3.2. werden die Ergebnisse morphometrischer Untersuchungen innerhalb einzelner Gesangsareale der AFP beschrieben.

3.1. Fasermarkierungsstudie

Bei adulten Tieren wurden die Verbindungen der AFP mit Hilfe von *in vivo* Injektionen fluoreszenter Marker in einzelne Gesangsareale der AFP untersucht.

3.1.1. „Tracer“-Applikationen bei Zebrafinkenmännchen

Bei sozial aufgezogenen Zebrafinkenmännchen wurden aus dem Projektionsverlauf der AFP die Verbindungen der Gehirnareale vom HVC in die Area-X, vom DLM in den LMAN und vom LMAN in den RA angefärbt. Außerdem wurden aus dem Projektionsverlauf der prämotorischen Bahn die Verbindungen vom HVC in den RA und vom RA in den DLM markiert (Tabelle 3).

Applikationsort	Transportrichtung	Zielgebiet	Verbindung	Zuordnung
HVC	anterograd	RA	HVC -> RA	prämotorische Bahn
HVC	anterograd	Area-X	HVC -> Area-X	AFP
DLM	anterograd	LMAN	DLM - > LMAN	AFP
LMAN	retrograd	DLM	DLM - > LMAN	AFP
LMAN	anterograd	RA	LMAN -> RA	AFP
RA	anterograd	DLM	RA -> DLM	prämotorische Bahn

Tab. 3: Tabellarische Übersicht der angefärbten Faserverbindungen innerhalb der AFP nach *in vivo* Applikationen von fluoreszenten Markern bei adulten sozial aufgezogenen Männchen. Bei den anterograd nachgewiesenen Verbindungen („anterograd“) wurde der Farbstoff von dem Applikationsort zu den Terminalen des Zielgebietes transportiert. Bei dem retrograden Transport („retrograd“) wurde der Farbstoff von den neuronalen Terminalen im Applikationsort aufgenommen und zu den Zellkörpern der Ursprungsregion transportiert.

Im Detail konnten nach „Tracer“-Applikationen in den HVC bei sozial aufgezogenen Zebrafinkenmännchen Verbindungen zur Area X und zum RA dargestellt werden. Durch anterograden Farbstofftransport wurde die Verknüpfung vom HVC zum RA angefärbt (Abbildung 13). Ebenfalls wurde durch anterograd verlaufenden Farbstofftransport die Fasern, die vom HVC zur Area-X verlaufen, angefärbt.

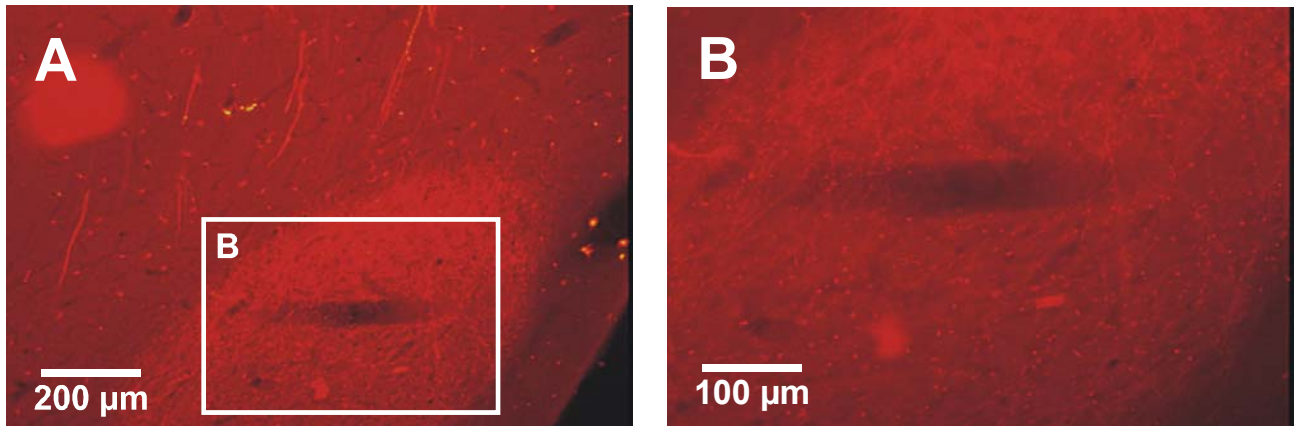


Abb. 13: A: RDA-markiertes Terminationsgebiet im RA eines adulten sozial aufgezogenen Zebrafinkenmännchens (Applikationsort: HVC). Der markierte Ausschnitt ist in B vergrößert dargestellt. B: Im RA sind die Terminalen der vom HVC kommenden Fasern markiert.

Die ebenfalls der AFP zugeordnete Projektion vom DLM in den LMAN wurde bei sozial aufgezogenen Zebrafinkenmännchen sowohl durch „Tracer“-Applikationen in den DLM (durch anterogrades Anfärben der Fasern) als auch nach „Tracer“-Applikation in den LMAN (durch retrogrades Anfärben der Fasern) dargestellt.

Des Weiteren wurde die Verbindung vom LMAN zum RA nach „Tracer“-Applikationen in den LMAN durch anterograd gefärbte Fasern gezeigt.

Zusätzlich wurde bei den sozial aufgezogenen Zebrafinkenmännchen nach „Tracer“-Applikation in den RA die der prämotorischen Bahn zugeordnete Projektion vom RA in den DLM durch anterogrades Anfärben der Fasern dargestellt.

3.1.2. „Tracer“-Applikationen bei Zebrafinkenweibchen

3.1.2.1. „Tracer“-Applikationen bei sozial aufgezogenen Weibchen

Bei sozial aufgezogenen Zebrafinkenweibchen wurden folgende Verbindungen, die der AFP zugeordnet werden, angefärbt: vom LMAN in das StM, vom StM in den DLM, vom DLM in den LMAN und vom LMAN in den RA (Tabelle 4).

Applikationsort	Transportrichtung	Zielgebiet	Verbindung	Zuordnung
DLM	retrograd	StM	StM -> DLM	AFP
DLM	anterograd	LMAN	DLM -> LMAN	AFP
LMAN	retrograd	DLM	DLM -> LMAN	AFP
LMAN	anterograd	StM	LMAN - > StM	AFP
LMAN	anterograd	RA	LMAN - > RA	AFP

Tab. 4: Tabellarische Übersicht der angefärbten Faserverbindungen innerhalb der AFP nach *in vivo* Applikationen von fluoreszenten Markern bei adulten sozial aufgezogenen Weibchen. Bei den anterograd nachgewiesenen Verbindungen („anterograd“) wurde der Farbstoff von dem Applikationsort zu den Terminalen des Zielgebietes transportiert. Bei dem retrograden Transport („retrograd“) wurde der Farbstoff von den neuronalen Terminalen im Applikationsort aufgenommen und zu den Zellkörpern der Ursprungsregion transportiert.

Im Detail wurden in der Gruppe der sozial aufgezogenen Zebrafinkenweibchen retrograd angefärbte Zellen im StM nach „Tracer“-Applikation in den DLM beobachtet, was auf eine Projektion aus dem StM in den DLM schließen lässt. Diese Verbindung wurde an Weibchen bisher noch nicht nachgewiesen. Ebenfalls nach DLM-Markierung wurden zum LMAN ziehende Fasern anterograd angefärbt. Diese Verbindung wurde auch durch retrograd gefärbte Fasern und retrograd angefärbte Zellen im DLM nach „Tracer“-Applikation in den LMAN gezeigt (Abbildung 14).

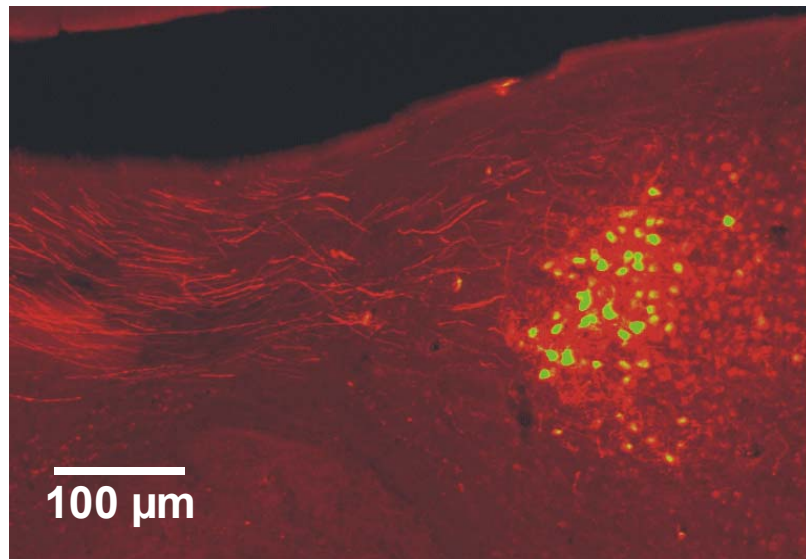


Abb. 14: Fluoreszenzmarkierte, vom DLM zum LMAN projizierende Nervenfasern in einem sozial aufgezogenen adulten Zebrafinkenweibchen. Applikationsort war der LMAN. Zu sehen sind im DLM durch retrograden Farbstofftransport angefärbte Zellkörper der Nervenzellen, die in den LMAN projizieren.

Die Verbindung vom LMAN in das StM konnte durch anterograd gefärbte Fasern nach „Tracer“-Applikationen in den LMAN dargestellt werden.

Außerdem wurde die Projektion vom LMAN in den RA nach „Tracer“-Applikationen in den LMAN durch anterograd gefärbte Fasern und Terminalen im RA dargestellt (Abbildung 15).

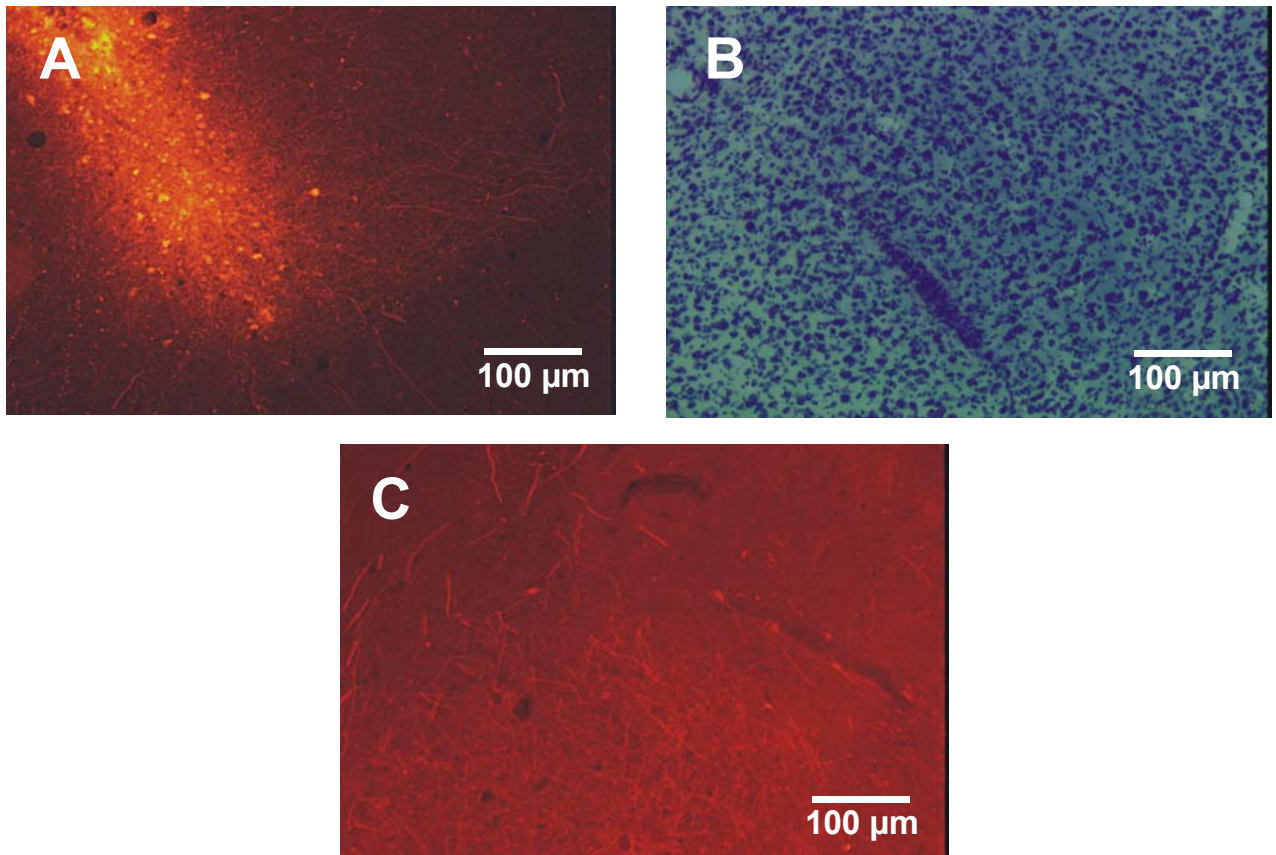


Abb. 15: Darstellung der Verbindung vom LMAN zum RA in einem adulten sozial aufgezogenen Zebrafinkenweibchen. Diese Verbindung wurde durch anterograden Farbstofftransport nach Injektion in den LMAN angefärbt.

A: Injektion von RDA in den LMAN

B: Applikationsstelle im Nissl-gefärbten Sagittalschnitt

C: Fluoreszenzmarkierte Fasern im RA

3.1.2.2. Tracer"-Applikationen bei gesangsdepriviert aufgezogenen Weibchen

Bei den gesangsdepriviert aufgezogenen Zebrafinkenweibchen wurden die Verbindungen der Gehirnareale vom DLM in den LMAN und vom LMAN in den RA nachgewiesen. Zusätzlich wurden aus dem Projektionsverlauf der prämotorischen Bahn die Verbindung vom RA in den DLM dargestellt (Tabelle 5).

Applikationsort	Transportrichtung	Zielgebiet	Verbindung	Zuordnung
LMAN	retrograd	DLM	DLM -> LMAN	AFP
LMAN	anterograd	RA	LMAN - > RA	AFP
DLM	retrograd	RA	RA -> DLM	prämotorische Bahn

Tab. 5: Tabellarische Übersicht der angefärbten Faserverbindungen nach *in vivo* Applikationen von fluoreszenten Markern bei adulten gesangsdepriviert aufgezogenen Weibchen. Bei den anterograd nachgewiesenen Verbindungen („anterograd“) wurde der Farbstoff von dem Applikationsort zu den Terminalen des Zielgebietes transportiert. Bei dem retrograden Transport („retrograd“) wurde der Farbstoff von den neuronalen Terminalen im Applikationsort aufgenommen und zu den Zellkörpern der Ursprungsregion transportiert.

In der Gruppe der gesangsdepriviert aufgezogenen Zebrafinkenweibchen wurde die zur AFP gehörende Verbindung vom DLM zum LMAN durch retrogrades Anfärben der Fasern nach Markierung des LMAN nachgewiesen (Abbildung 16).

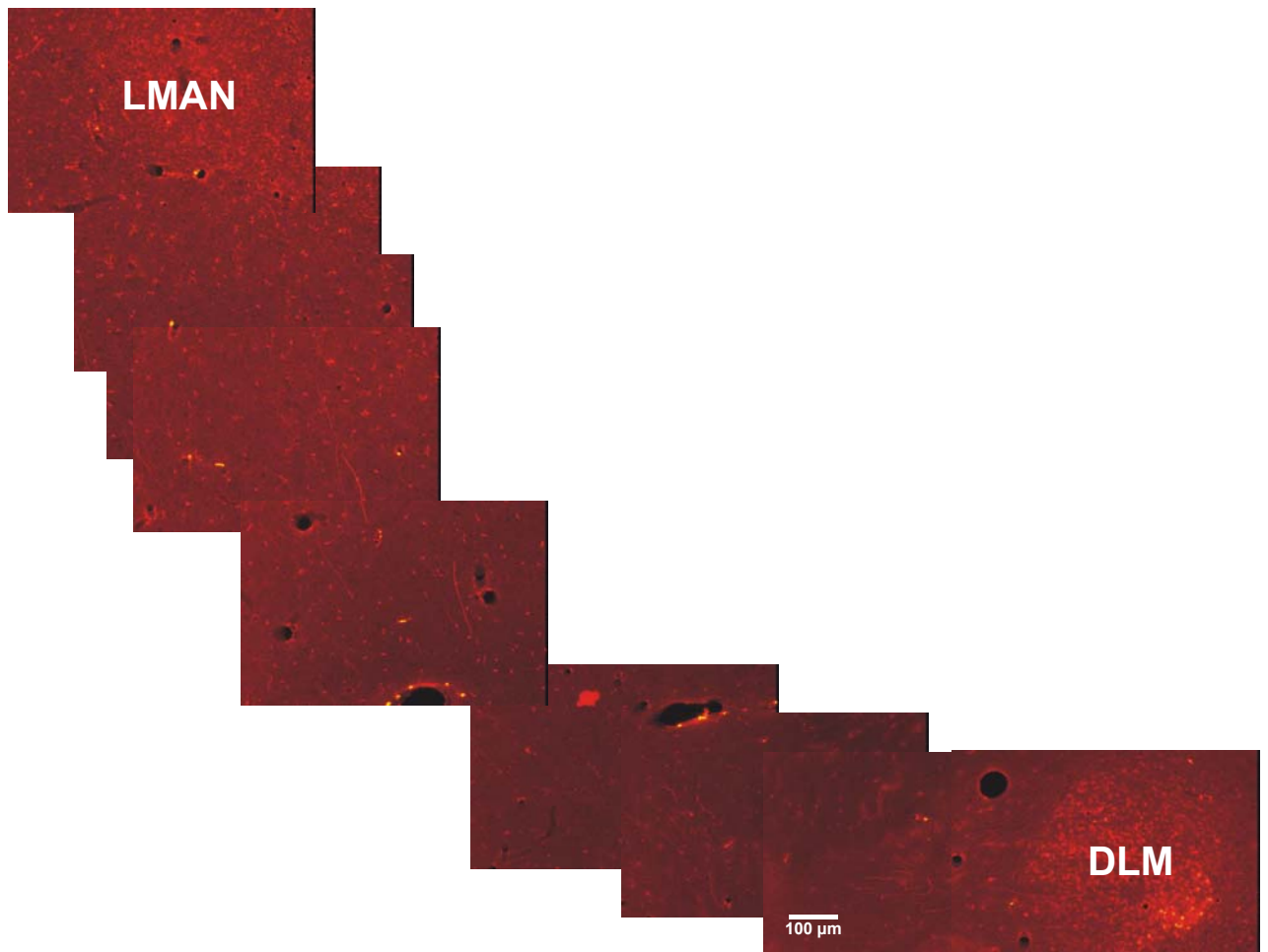


Abb. 16: Kollage aus neun Einzelbildern zur Darstellung der Verbindung vom DLM zum LMAN an einem adulten gesangsdepriviert aufgezogenen Zebrafinkenweibchen. Der Applikationsort war der LMAN. Über retrograden Transport von RDA wurde der DLM markiert.

Die vom LMAN in den RA ziehenden Nervenfasern wurden bei gesangsdepriviert aufgezogenen Zebrafinkenweibchen durch anterogrades Anfärben nach „Tracer“-Applikation in den LMAN gezeigt. Ebenso wurde bei den gesangsdepriviert aufgezogenen Zebrafinkenweibchen die Projektion vom RA in den DLM, die der prämotorischen Bahn zugeordnet wird, durch anterogrades Anfärben der Fasern nach „Tracer“-Applikation in den RA dargestellt (Abbildung 17).

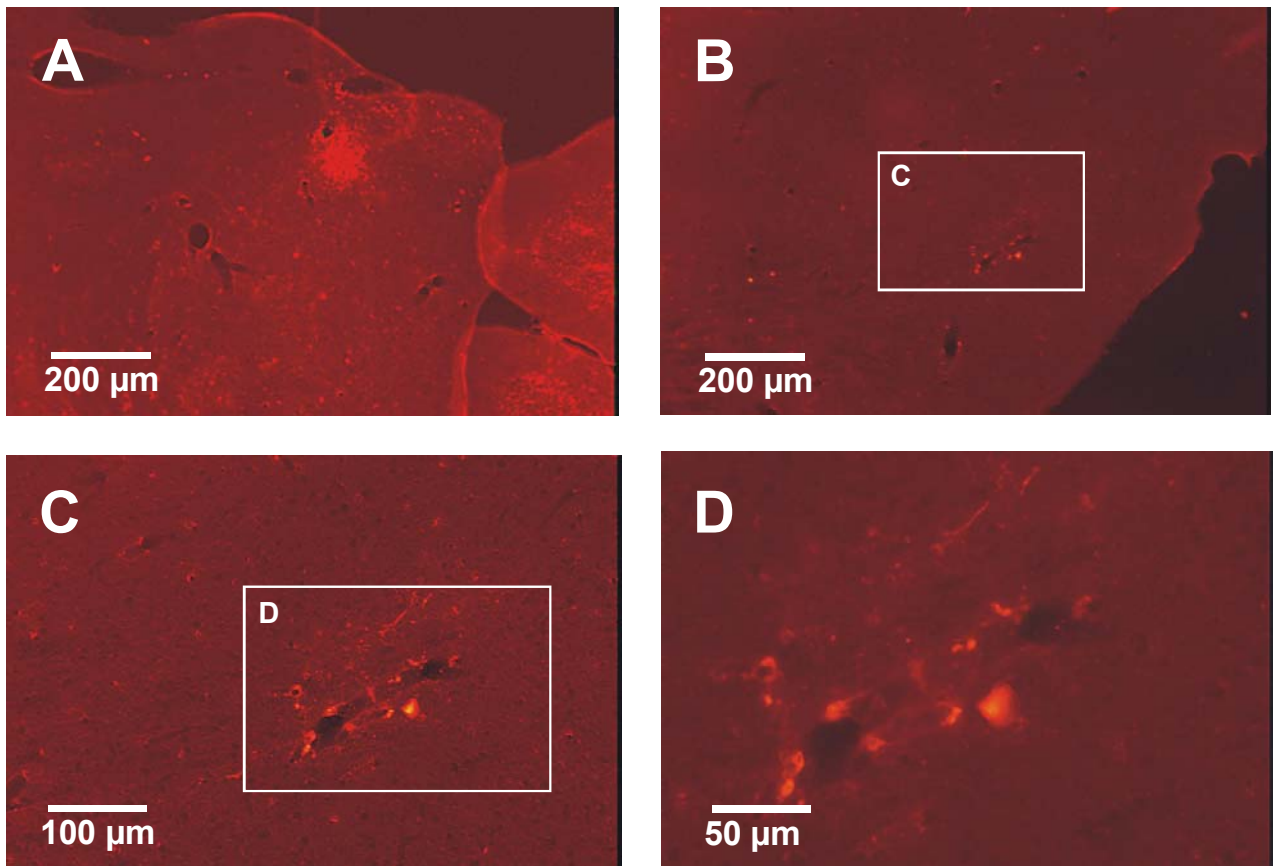


Abb. 17: Darstellung der Verbindung vom RA zum DLM in einem adulten gesangsdepriviert aufgezogenen Zebrafinkenweibchen.

A: Applikationsort war der DLM

B: Retrograd markierte Zellkörper im RA

C: Ausschnittsvergrößerung aus B

D: Ausschnittsvergrößerung aus C

3.1.3. Zusammenfassung der Ergebnisse der Fasermarkierungsstudie

Beim Vergleich der neuronalen Projektionen innerhalb des Gesangssystems zwischen Männchen und Weibchen, wurden bei sozial aufgezogenen Zebrafinkenmännchen die bereits bekannten Verbindungen der AFP vom HVC in die Area-X, vom DLM zum LMAN, vom LMAN zum RA, sowie Verbindungen der prämotorischen Schleife vom HVC zum RA, und vom RA zum DLM, bestätigt.

Bei sozial aufgezogenen Zebrafinkenweibchen konnten neben den bereits bekannten Verbindungen der AFP vom LMAN in das Gebiet des StM und vom LMAN zum RA, auch die Verbindungen vom StM zum DLM, und vom DLM zum LMAN dargestellt werden. Diese Untersuchungen zur Verschaltung der AFP weisen darauf hin, dass die neuronalen Verbindungen zwischen den Gesangsarealen bei Zebrafinkenmännchen und Zebrafinkenweibchen ähnlich ausgebildet sind. Ferner konnte gezeigt werden, dass in gesangsdepriviert aufgezogenen Zebrafinkenweibchen ebenso wie in sozial aufgezogenen Weibchen eine Verbindung vom LMAN zum RA ausgebildet ist, sowie die zur prämotorischen Bahn gehörige Verbindung vom RA zum DLM.

3.2. Morphometrische Studie

In der morphometrischen Studie wurden die Folgen gesangsdeprivierter Aufzucht auf die Gesangsareale der AFP bezüglich ihrer Volumenausbildung, Neuronendichte, Neuronenanzahl sowie der neuronalen Soma- und Nukleusanschnittsflächen untersucht. Die Untersuchungen erfolgten an adulten sozial beziehungsweise gesangsdepriviert aufgezogenen Männchen und Weibchen.

Darüber hinaus wurden geschlechtsspezifische Unterschiede in der Gruppe der sozial aufgezogenen Tiere und in der Gruppe der gesangsdepriviert aufgezogenen Tiere untersucht. Im Folgenden werden die Ergebnisse, die innerhalb des jeweiligen Gesangsareals ermittelt wurden, dem Projektionsweg vom HVC ausgehend der AFP folgend beschrieben.

3.2.1. HVC

Der im Telencephalon gelegene HVC projiziert sowohl zur Area X als auch zum RA (Abbildung 4).

3.2.1.1. Folgen gesangsdeprivierter Aufzucht im HVC

Das HVC-Volumen gesangsdepriviert aufgezogener Männchen war 22 % kleiner als das HVC-Volumen sozial aufgezogener Männchen. Die beiden Aufzuchtgruppen unterschieden sich signifikant voneinander (gesangsdepriviert aufgezogene Männchen (M.depr.): $0,33 \pm 0,05 \text{ mm}^3$ *versus* sozial aufgezogene Männchen (M.soz.): $0,42 \pm 0,08 \text{ mm}^3$; $p = 0,02$; Tabelle 6 und Abbildungen 18 A, B; 20, 21).

	MÄNNCHEN		WEIBCHEN	
	sozial	depriviert	sozial	depriviert
Gesangsareal- volumen (mm³)	0,42 ± 0,08 N = 11	0,33 ± 0,05 N = 7	0,06 ± 0,03 N = 6	0,05 ± 0,02 N = 7
Neuronendichte (10⁵ µm³)	20,33 ± 5,26 N = 12	19,68 ± 5,09 N = 7	12,71 ± 4,64 N = 7	9,84 ± 4,01 N = 7
Neuronenanzahl	82475 ± 23461 N = 12	63963 ± 16544 N = 7	7308 ± 3180 N = 6	4317 ± 1921 N = 7
Somaanschnitts- flächen (µm²)	99,40 ± 11,01 N = 12	107,55 ± 9,85 N = 7	79,30 ± 10,62 N = 7	87,60 ± 13,96 N = 7
Nukleusanschnitts- flächen (µm²)	57,70 ± 5,91 N = 12	58,41 ± 6,72 N = 7	47,87 ± 8,86 N = 7	55,35 ± 9,43 N = 7

Tab. 6: Die Ergebnisse zu den Untersuchungsparametern: Volumen, Neuronendichte, Neuronenanzahl, Somaanschnittsflächen und Nukleusanschnittsflächen des Gehirnareals HVC sind in Form von Mittelwert ± Standardabweichung zusammengefasst; N: Anzahl der Tiere.

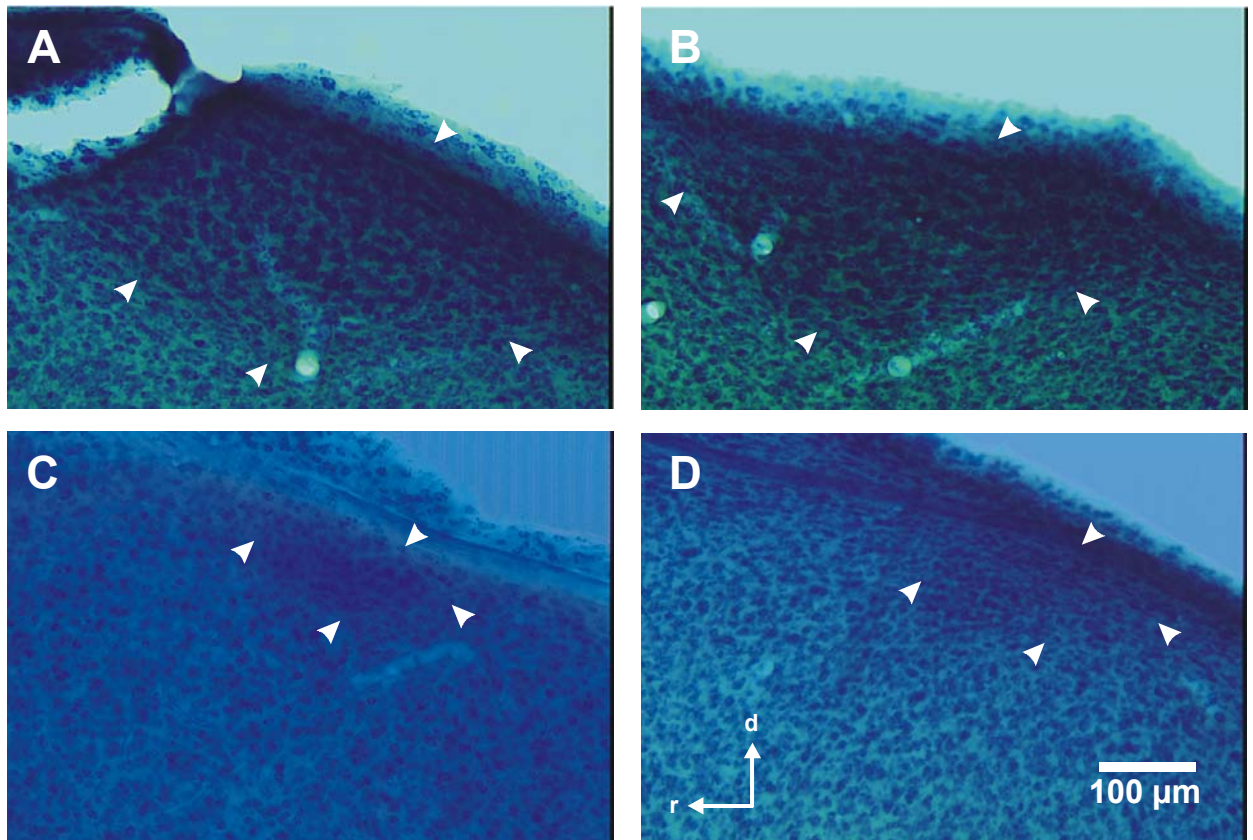


Abb. 18: Lichtmikroskopische Aufnahmen 100 µm dicker, Nissl-gefärbter Sagittalschnitte zeigen HVC-Volumenanschnittsflächen adulter sozial (A) und gesangsdepriviert (B) aufzogener Zebrafinkenmännchen und adulter sozial (C) und gesangsdepriviert (D) aufzogener Zebrafinkenweibchen. Aus Serienschnitten dieser Volumenanschnittsflächen wurden die HVC-Volumina (der jeweiligen Untersuchungsgruppen) bestimmt. Das HVC-Volumen war bei sozial aufgezogenen Zebrafinkenmännchen signifikant größer ausgebildet als bei gesangsdepriviert aufgezogenen Zebrafinkenmännchen. Des Weiteren war das HVC-Volumen der Männchen in beiden Aufzuchtgruppen größer als das der jeweils gleich aufgezogenen Weibchen. Pfeilspitzen markieren den HVC (Abkürzungen: d: dorsal, r: rostral).

Bezüglich der weiteren untersuchten Parameter, wie der Neuronendichte, der Neuronenanzahl und der Größe der Anschnittsfläche von Somata und Nuklei, gab es bei den Männchen zwischen sozial und gesangsdepriviert aufgezogenen Tieren keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 6 und Abbildungen 19 A, B; 20, 21).

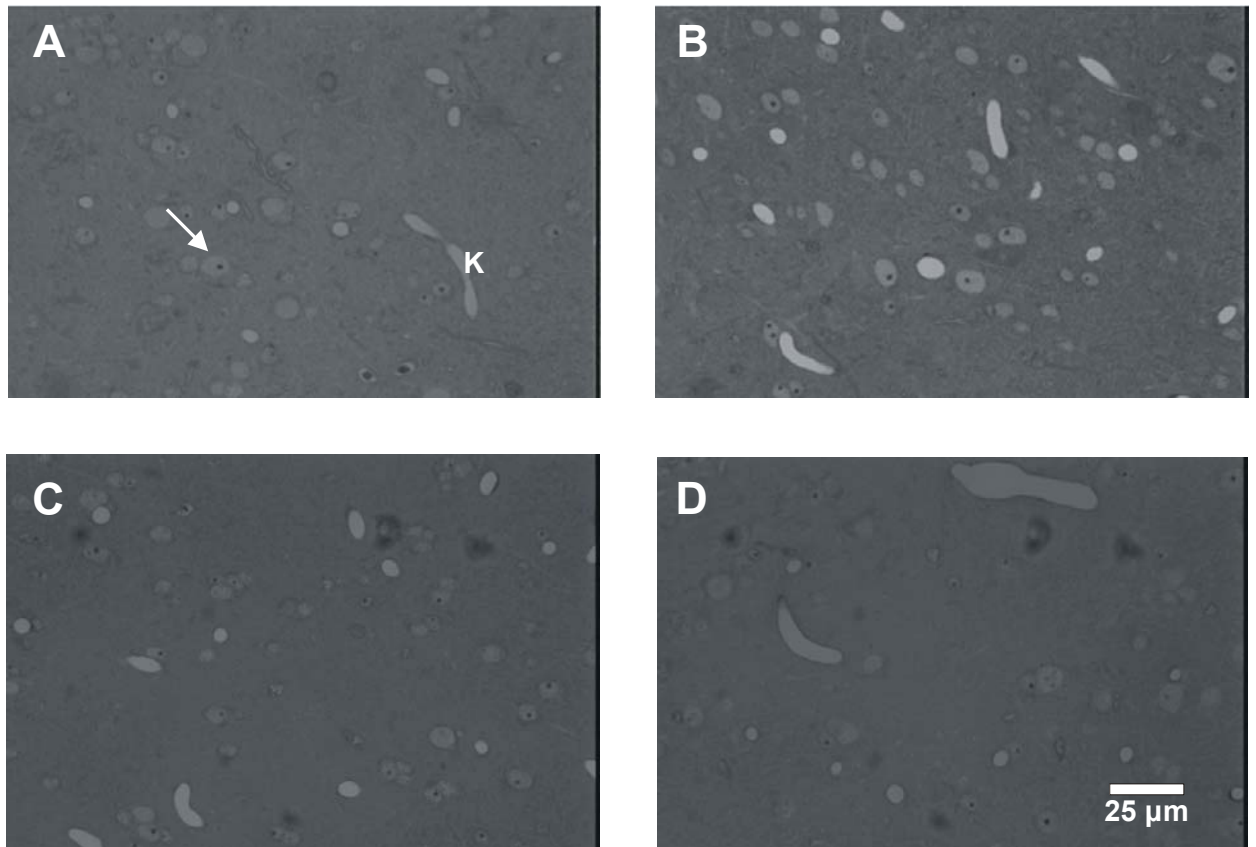


Abb. 19: Vergleich der Zellgröße und Zelldichte im HVC adulter sozial (A) und gesangsdepriviert (B) aufgezogener Zebrafinkenmännchen und adulter sozial (C) und gesangsdepriviert (D) aufgezogener Zebrafinkenweibchen anhand lichtmikroskopischer Aufnahmen von Semidünnschnitten. Die gesangsdeprivierte Aufzucht hatte keine Auswirkungen auf Zellgröße, Zelldichte oder Zellanzahl. Der Vergleich zwischen den Geschlechtern ergab, dass Zebrafinkenweibchen signifikant weniger Zellen im HVC besitzen als Zebrafinkenmännchen, und dass bei den Zebrafinkenweibchen die Zellen im HVC signifikant kleiner sind als bei den Zebrafinkenmännchen. Dies traf bei den gesangsdepriviert aufgezogenen Tieren gleichermaßen zu wie bei den sozial aufgezogenen Tieren (Schnittdicke: 1 µm; K: Blutkapillare, Pfeil markiert die Anschnittsfläche eines Nukleus mit Nukleolus).

Bei den Weibchen waren keine durch gesangsdeprivierte Aufzucht bedingten Veränderungen des HVC beobachtet worden. Gesangsdepriviert aufgezogene Weibchen unterschieden sich nicht signifikant von sozial aufgezogenen Weibchen bezüglich des HVC-Volumens und der Größe der Anschnittsflächen von Somata und Nuklei. Neuronendichte und -anzahl waren im Schnitt bei den gesangsdepriviert aufgezogenen Weibchen geringer als bei den sozial aufgezogenen, doch führte das

angesichts der großen Streuung bei der gegebenen Stichprobe nicht zur Signifikanz (Tabelle 6 und Abbildungen 18 C, D; 19 C, D; 20, 21).

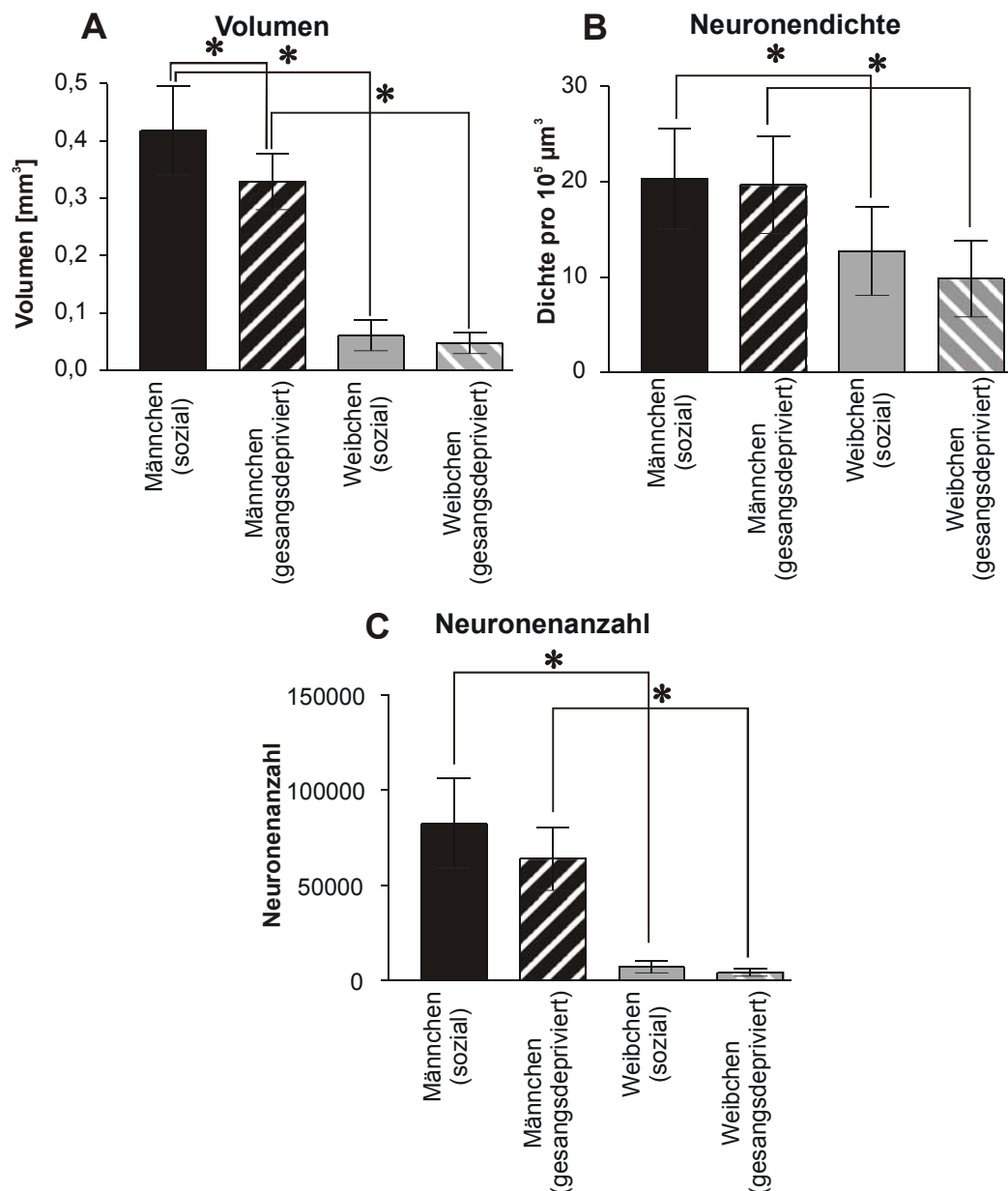


Abb. 20: Vergleich der verschiedenen Aufzuchtgruppen und der Geschlechter bezüglich des HVC-Volumens (A), der Neuronendichte (B) und der Neuronenanzahl (C) im HVC anhand der Mittelwerte \pm Standardabweichung pro Gruppe; Sternchen markieren signifikante Unterschiede (schwarz: sozial aufgezogene Zebrafinkenmännchen; schwarz-weiß gestreift: gesangsdepriviert aufgezogene Männchen; grau: sozial aufgezogene Zebrafinkenweibchen; grau-weiß gestreift: gesangsdepriviert aufgezogene Zebrafinkenweibchen).

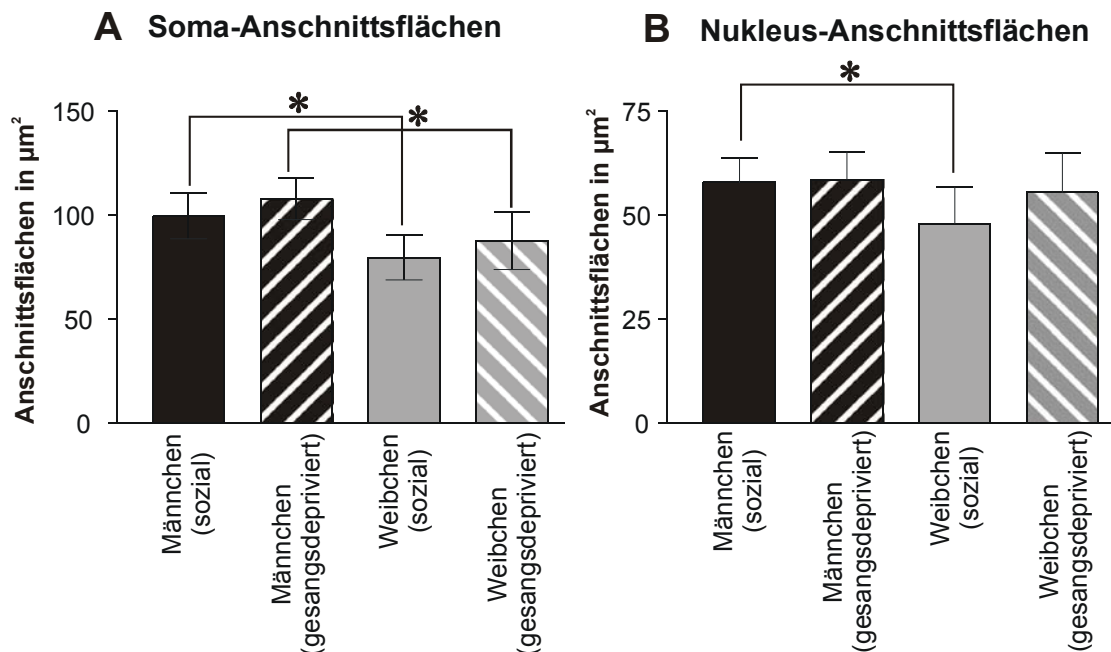


Abb. 21: Vergleich der verschiedenen Aufzuchtgruppen und der Geschlechter bezüglich der Somaanschnittsflächen (A) und der Nukleusanschnittsflächen (B) im HVC anhand der Mittelwerte \pm Standardabweichung pro Gruppe; Sternchen markieren signifikante Unterschiede (schwarz: sozial aufgezogene Zebrafinkenmännchen; schwarz-weiß gestreift: gesangsdepriviert aufgezogene Männchen; grau: sozial aufgezogene Zebrafinkenweibchen; grau-weiß gestreift: gesangsdepriviert aufgezogene Zebrafinkenweibchen).

3.2.1.2. Geschlechtsspezifische Untersuchungen im HVC

Der Vergleich zwischen Männchen und Weibchen zeigte in der Gruppe der sozial aufgezogenen Tiere ein durchweg sexualdimorph geprägtes Verhältnis (Tabelle 6 und Abbildung 20, 21). Das HVC-Volumen der sozial aufgezogenen Weibchen betrug nur 14 % des HVC-Volumens sozial aufzogener Männchen (sozial aufgezogene Weibchen (W.soz.): $0,06 \pm 0,03 \text{ mm}^3$ versus M.soz.: $0,42 \pm 0,08 \text{ mm}^3$; $p = 0,0001$; Tabelle 6 und Abbildungen 18 A, C; 20, 21). Die Neuronendichte im HVC sozial aufzogener Weibchen war 37 % kleiner als bei den gleichartig aufgezogenen Männchen (W.soz.: $12,71 \pm 4,64$ pro 100000 µm^3 versus M.soz.: $20,33 \pm 5,26$ pro 100000 µm^3 ; $p = 0,006$). Die Neuronenanzahl im HVC sozial aufzogener Weibchen betrug etwa ein Zehntel

der Neuronenanzahl im HVC bei Männchen (W.soz.: 7308 ± 3180 *versus* M.soz.: 82475 ± 23461 ; $p = 0,0001$). Die Somaanschnittsflächen der Neurone im HVC sozial aufgezogener Weibchen waren 20 % kleiner als die der sozial aufgezogenen Männchen (W.soz.: $79,30 \pm 10,62 \mu\text{m}^2$ *versus* M.soz.: $99,40 \pm 11,01 \mu\text{m}^2$; $p = 0,001$), und die Nukleusanschnittsflächen der Neurone im HVC sozial aufgezogener Weibchen waren 17 % kleiner als die der sozial aufgezogenen Männchen (W.soz.: $47,87 \pm 8,86 \mu\text{m}^2$ *versus* M.soz.: $57,70 \pm 5,91 \mu\text{m}^2$; $p = 0,01$; Tabelle 6 und Abbildungen 19 A, C; 20, 21). Das Verhältnis zwischen den Geschlechtern in der Gruppe der gesangsdepriviert aufgezogenen Tiere war ebenfalls sexualdimorph geprägt. Das HVC-Volumen gesangsdepriviert aufgezogener Weibchen betrug nur 15 % des HVC-Volumens der gesangsdepriviert aufgezogenen Männchen und war signifikant verschieden (gesangsdepriviert aufgezogene Weibchen (W.depr.): $0,05 \pm 0,02$ *versus* M.depr.: $0,33 \pm 0,05$; $p = 0,0001$). Die Neuronendichte im HVC gesangsdepriviert aufgezogener Weibchen war etwa nur halb so hoch wie bei den gesangsdepriviert aufgezogenen Männchen (W.depr.: $9,84 \pm 4,01$ *versus* M.depr.: $19,68 \pm 5,09$; $p = 0,006$), und die Neuronenanzahl der Weibchen war nur etwa ein Zehntel so hoch wie bei den Männchen (W.depr.: 4317 ± 1921 *versus* M.depr.: 63963 ± 16544 ; $p = 0,0001$). Auch die Somaanschnittsflächen der gesangsdepriviert aufgezogenen Weibchen waren signifikant kleiner (-18 %) als die der gleichartig aufgezogenen Männchen (W.depr.: $87,60 \pm 13,96$ *versus* M.depr.: $107,55 \pm 9,85$; $p = 0,001$; Tabelle 6 und Abbildungen 18 B, D; 19 B, D; 20, 21).

Einzig die Nukleusanschnittsflächen unterschieden sich im HVC bei gesangsdepriviert aufgezogenen Männchen ($58,41 \pm 6,72 \mu\text{m}^2$) und Weibchen ($55,35 \pm 9,43 \mu\text{m}^2$) nicht signifikant voneinander ($p = 0,49$; Tabelle 6 und Abbildungen 20 B, D; 21, 22).

3.2.2. Area-X

Das im medialen Striatum gelegene Gesangsareal Area-X wird sowohl vom HVC als auch vom LMAN innerviert. Das Area-X-Volumen konnte anhand der Nissl gefärbten Präparate nur bei den Zebrafinkenmännchen bestimmt werden, da die Area-X bei Zebrafinkenweibchen nicht nachweisbar ist. Bei adulten Zebrafinkenmännchen war die Area-X das am größten ausgebildete Hirnareal des Gesangssystems. Bei adulten sozial aufgezogenen Männchen war die Area-X ($1,36 \pm 0,28 \text{ mm}^3$) dreimal größer als der HVC ($0,42 \pm 0,08 \text{ mm}^3$) und sogar etwa 13 mal größer als der DLM ($0,10 \pm 0,04 \text{ mm}^3$).

3.2.2.1. Folgen gesangsdeprivierter Aufzucht auf die Area-X

Untersuchungen bezüglich gesangsdeprivierter Aufzucht ergaben, dass die Area-X adulter gesangsdepriviert aufgezogener Männchen ähnlich groß ausgebildet war wie die der adulten sozial aufgezogenen Männchen. Die beiden Gruppen unterschieden sich nicht signifikant voneinander (Tabelle 7 und Abbildungen 22, 23).

	MÄNNCHEN	
	sozial	depriviert
Gesangsareal-volumen (mm^3)	$1,36 \pm 0,29$ N = 12	$1,3 \pm 0,20$ N = 7

Tab. 7: Die Ergebnisse der Untersuchung des Area-X-Volumens sind in Form von Mittelwert \pm Standardabweichung zusammengefasst; N: Anzahl der Tiere.

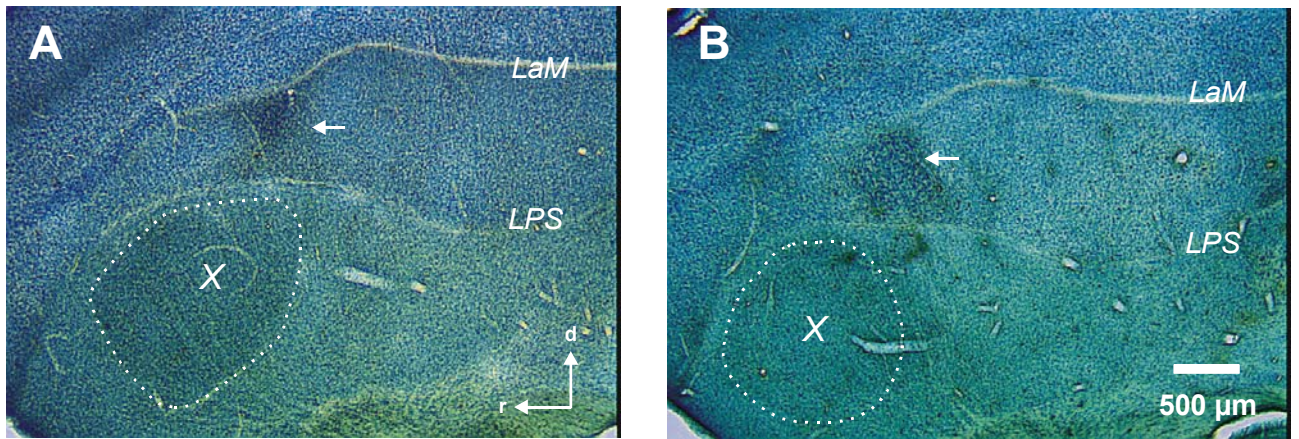


Abb. 22: Lichtmikroskopische Aufnahmen 100 µm dicker, Nissl-gefärbter Sagittalschnitte zeigen Area-X-Volumenanschnittsflächen adulter sozial (A) und gesangsdepriviert (B) aufgezogener Zebrafinkenmännchen. Aus Serienschnitten dieser Volumenanschnittsflächen wurden die Area-X-Volumina (der jeweiligen Untersuchungsgruppen) bestimmt. Das Area-X-Volumen war bei sozial und gesangsdepriviert aufgezogenen Zebrafinkenmännchen nicht signifikant verschieden. Ein Pfeil markiert das Gesangsareal LMAN (Abkürzungen: LaM: Lamina mesopallialis, LPS: Lamina pallio-subpallialis, X: Area-X; d: dorsal, r: rostral).

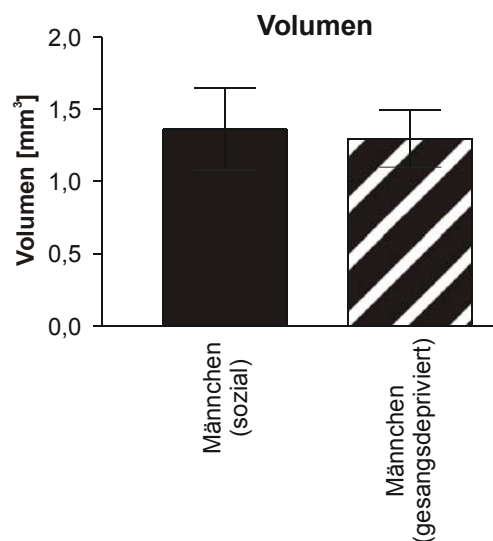


Abb. 23: Vergleich der Volumina der Area-X adulter sozial aufgezogener Zebrafinkenmännchen (schwarz) mit adulten gesangsdepriviert aufgezogenen Zebrafinkenmännchen (schwarz-weiß gestreift). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung.

3.2.3. Nucleus dorsolateralis medialis des anterioren Thalamus (DLM)

Das im Thalamus gelegene Gesangsareal DLM ist, sowohl in den Projektionsverlauf der AFP als auch in den der prämotorischen Bahn eingebunden. Während er, die prämotorische Bahn betreffend, vom RA innerviert wird, erhält er im Rahmen der AFP Projektionen aus der Area-X.

3.2.3.1. Folgen gesangsdeprivierter Aufzucht im DLM

Volumenuntersuchungen am DLM adulter Zebrafinken ließen bei Männchen Folgen gesangsdeprivierter Aufzucht erkennen. Das DLM-Volumen gesangsdepriviert aufgezogener Männchen war um 60 % größer als das DLM-Volumen sozial aufgezogener Männchen (M.depr.: $0,16 \pm 0,05 \text{ mm}^3$ versus M.soz.: $0,10 \pm 0,04 \text{ mm}^3$; $p = 0,04$; Tabelle 8 und Abbildungen 24, 25).

	MÄNNCHEN		WEIBCHEN	
	sozial	depriviert	sozial	depriviert
Gesangsareal-volumen (mm^3)	$0,1 \pm 0,04$ N = 6	$0,16 \pm 0,05$ N = 6	0,14 N = 1	$0,14 \pm 0,04$ N = 5

Tab. 8: Die Ergebnisse der Untersuchung des DLM-Volumens sind in Form von Mittelwert \pm Standardabweichung zusammengefasst; N: Anzahl der Tiere.

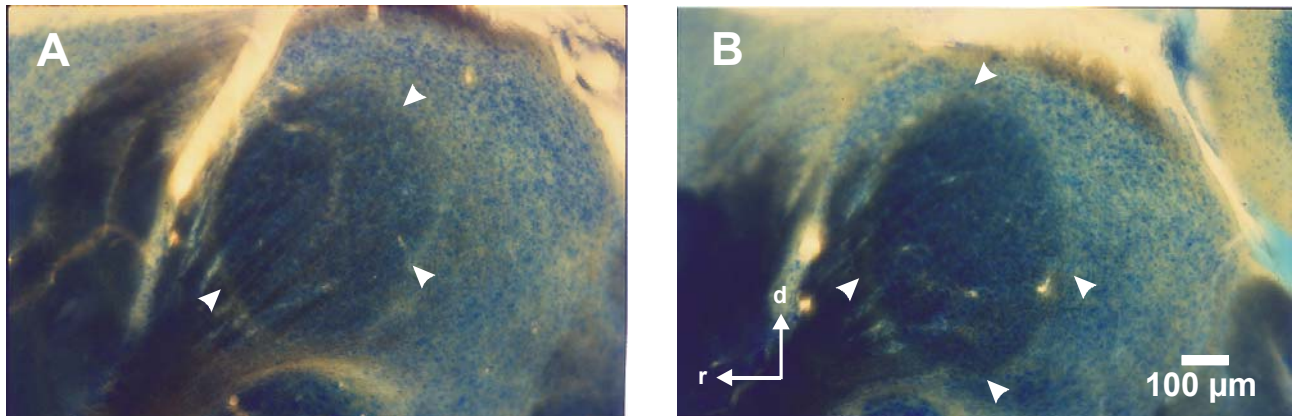


Abb. 24: Lichtmikroskopische Aufnahmen 100 µm dicker, Nissl-gefärbter Sagittalschnitte zeigen DLM-Volumenanschnittsflächen adulter sozial (A) und gesangsdepriviert (B) aufgezogener Zebrafinkenmännchen. Aus Serienschnitten dieser Volumenanschnittsflächen wurden die DLM-Volumina (der jeweiligen Untersuchungsgruppen) bestimmt. Der DLM war bei gesangsdepriviert aufgezogenen Zebrafinkenmännchen signifikant größer ausgebildet als bei sozial aufgezogenen Zebrafinkenmännchen. Pfeilspitzen markieren den DLM (Abkürzungen: d: dorsal, r: rostral).

Bei den Weibchen konnte aufgrund der kleinen Stichprobe in der Gruppe der sozial aufgezogenen Tiere kein statistischer Vergleich zwischen den beiden verschiedenen Aufzuchtgruppen durchgeführt werden (Tabelle 8). Aus dem gleichen Grund blieb auch ein statistischer Vergleich zwischen den DLM-Volumina sozial aufgezogener Männchen und Weibchen aus. Die Werte deuten beim Vergleich innerhalb der Weibchen zwischen sozial ($0,14 \text{ mm}^3$) und gesangsdepriviert ($0,14 \pm 0,02 \text{ mm}^3$) aufgezogenen Tieren nicht auf einen Unterschied hin (Tabelle 8 und Abbildung 24, 25).

Gesangsdepriviert aufgezogene Weibchen unterschieden sich bezüglich des DLM-Volumens nicht signifikant von gesangsdepriviert aufgezogenen Männchen (Tabelle 8 und Abbildung 25).

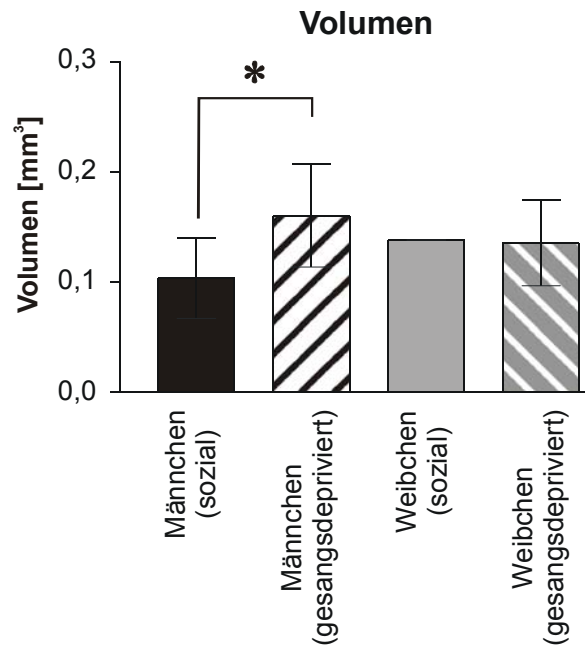


Abb. 25: DLM-Volumina adulter sozial aufzogener Zebrafinkenmännchen (schwarz), adulter gesangsdepriviert aufzogener Zebrafinkenmännchen (schwarz-weiß gestreift), adulter sozial aufzogener Zebrafinkenweibchen (grau) und adulter gesangsdepriviert aufzogener Zebrafinkenweibchen (grau-weiß gestreift). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. Sternchen markieren signifikante Unterschiede.

3.2.4. Nucleus lateralis magnocellularis nidopallii anterioris (LMAN)

Das im anterioren Vorderhirn gelegene Gesangsareal LMAN wird im Projektionsverlauf der AFP vom DLM innerviert.

3.2.4.1. Folgen gesangsdeprivierter Aufzucht im LMAN

Vergleichende Untersuchungen am LMAN sozial und gesangsdepriviert aufgezogener Männchen ließen keinen Einfluss durch gesangsdeprivierte Aufzucht erkennen. So unterschied sich das LMAN-Volumen gesangsdepriviert aufgezogener Männchen nicht signifikant vom LMAN-Volumen sozial aufgezogener Männchen (Tabelle 9 und Abbildung 26 A, B).

	MÄNNCHEN		WEIBCHEN	
	sozial	depriviert	sozial	depriviert
Gesangsareal-volumen (mm³)	0,20 ± 0,04 N = 12	0,21 ± 0,09 N = 7	0,23 ± 0,06 N = 7	0,23 ± 0,08 N = 7
Neuronendichte (10⁵ µm³)	6,16 ± 1,63 N = 12	5,87 ± 2,62 N = 7	22,48 ± 3,86 N = 7	21,11 ± 6,33 N = 7
Neuronenanzahl	11663 ± 3988 N = 12	11209 ± 3632 N = 7	48796 ± 14475 N = 7	45321 ± 7914 N = 7
Somaanschnitts-flächen (µm²)	190,49 ± 37,84 N = 11	198,02 ± 27,15 N = 6	90,25 ± 14,75 N = 7	91,98 ± 13,19 N = 7
Nukleusanschnitts-flächen (µm²)	95,04 ± 16,56 N = 11	96,45 ± 12,36 N = 6	50,26 ± 5,43 N = 7	57,94 ± 9,30 N = 7

Tab. 9: Die Ergebnisse der Untersuchungsparameter: Volumen, Neuronendichte, Neuronenanzahl, Somaanschnittsflächen und Nukleusanschnittsflächen des Gehirnareals LMAN sind in Form von Mittelwert ± Standardabweichung zusammengefasst; N: Anzahl der Tiere.

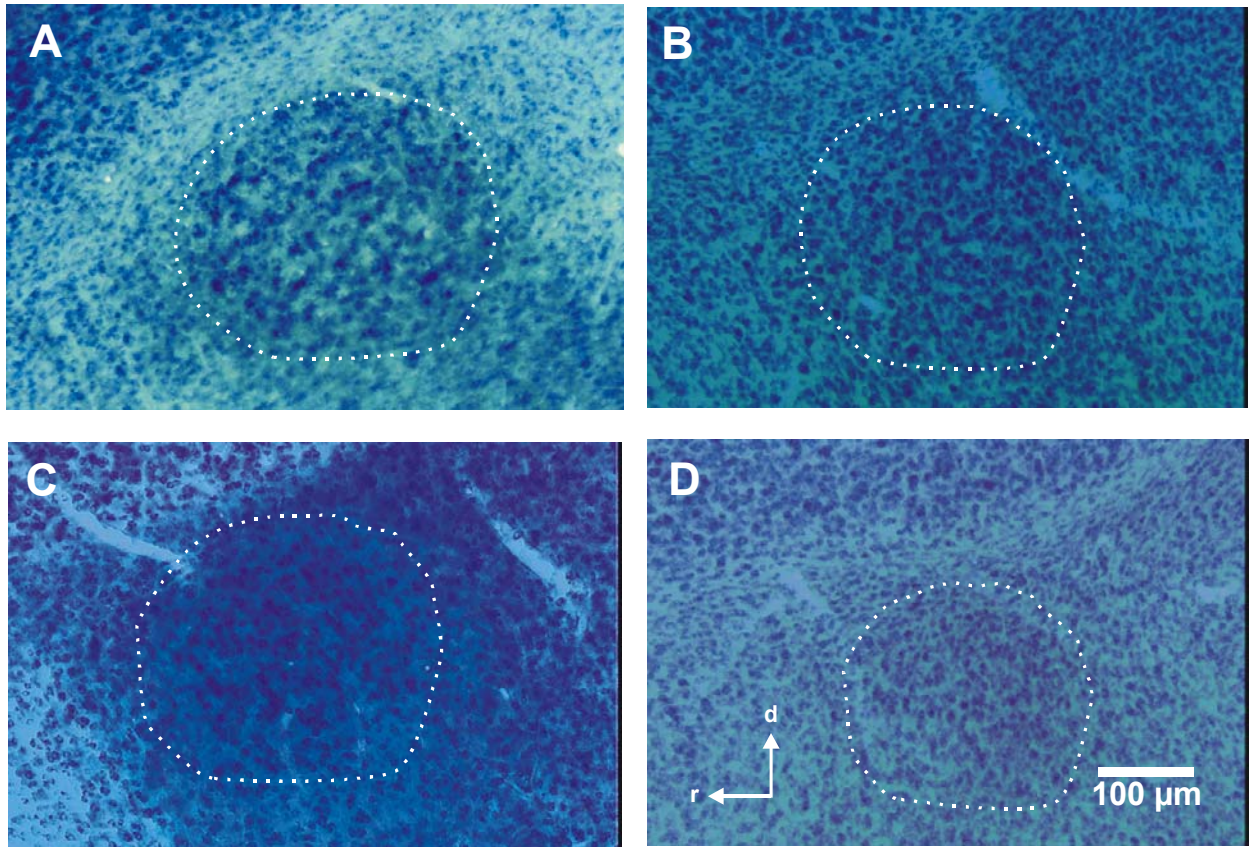


Abb. 26: Lichtmikroskopische Aufnahmen 100 µm dicker, Nissl-gefärbter Sagittalschnitte zeigen LMAN-Volumenanschnittsflächen adulter sozial (A) und gesangsdepriviert (B) aufzogener Zebrafinkenmännchen und adulter sozial (C) und gesangsdepriviert (D) aufzogener Zebrafinkenweibchen. Aus Serienschnitten dieser Volumenanschnittsflächen wurden die LMAN-Volumina (der jeweiligen Untersuchungsgruppen) bestimmt. Die LMAN-Volumina unterschieden sich weder innerhalb eines Geschlechts zwischen den Aufzuchtgruppen noch zwischen den Geschlechtern (Abkürzungen: d: dorsal, r: rostral).

Auch bezüglich der Neuronendichte und der Neuronenanzahl gab es im LMAN keinen signifikanten Unterschied zwischen gesangsdepriviert und sozial aufgezogenen Männchen. Ebenso verhielt es sich bezüglich der Somaanschnittsflächen und der Nukleusanschnittsflächen (Tabelle 9 und Abbildungen 27 A, B; 28, 29).

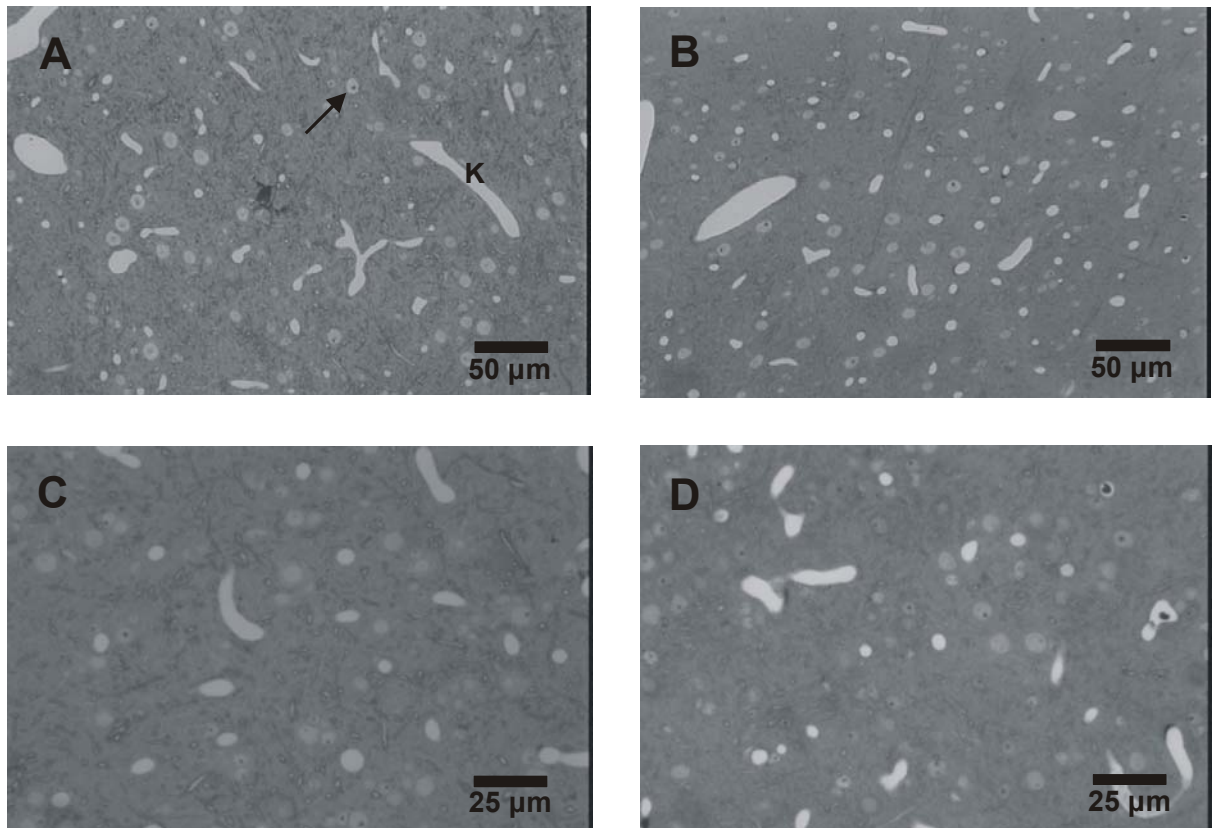


Abb. 27: Vergleich der Zellgröße und Zelldichte im LMAN adulter sozial (A) und gesangsdepriviert (B) aufzogener Zebrafinkenmännchen und adulter sozial (C) und gesangsdepriviert (D) aufzogener Zebrafinkenweibchen anhand lichtmikroskopischer Aufnahmen von Semidünnschnitten (Schnittdicke: 1 µm; K: Blutkapillare, Pfeil markiert die Anschnittsfläche eines Nukleus mit Nukleolus). Die gesangsdeprivierte Aufzucht hatte keine Auswirkungen auf Zellgröße, Zelldichte oder Zellanzahl. Der Vergleich zwischen den Geschlechtern ergab, dass Zebrafinkenweibchen, unabhängig davon, ob sie sozial- oder gesangsdepriviert aufgezogen wurden, signifikant mehr und kleinere Zellen im LMAN haben als Zebrafinkenmännchen. Dies verhielt sich bei den sozial und bei den gesangsdepriviert aufgezogenen Tieren gleichermaßen.

Im LMAN von Weibchen wirkte sich die gesangsdeprivierte Aufzucht ebenso wie bei den Männchen nicht verändernd auf die untersuchten neuronalen Strukturen aus. Das LMAN-Volumen gesangsdeprivierter Weibchen unterschied sich nicht signifikant von dem sozial aufzogener Weibchen. Auch bezüglich der Neuronendichte, der Neuronenanzahl und der Soma- und Nukleusanschnittsflächen unterschieden sich die gesangsdepriviert aufgezogenen Weibchen nicht von den sozial aufgezogenen Weibchen (Tabelle 9 und Abbildungen 26 C, D; 27).

3.2.4.2. Geschlechtsspezifische Untersuchungen im LMAN

Der Vergleich zwischen Männchen und Weibchen ergab, dass das LMAN-Volumen sozial aufgezogener Tiere in beiden Geschlechtern gleich groß ausgebildet war. In allen weiteren untersuchten Parametern wurde im LMAN ein starker Sexualdimorphismus beobachtet. So war die Neuronendichte im LMAN bei sozial aufgezogenen Weibchen viermal höher als bei sozial aufgezogenen Männchen und unterschied sich signifikant von der Neuronendichte im LMAN sozial aufzogener Männchen (W.soz.: $22,48 \pm 1,28$ pro $100000 \mu\text{m}^3$ *versus* M.soz.: $6,16 \pm 0,46$ pro $100000 \mu\text{m}^3$; $p = 0,0001$). Auch die Neuronenanzahl war bei Weibchen viermal höher als bei Männchen (W.soz.: 48796 ± 5471 *versus* M.soz.: 11663 ± 1151 ; $p = 0,0001$). Die Größe der LMAN-Neurone betrug bei Weibchen hingegen nur etwa die Hälfte der Neuronengröße bei Männchen. Die Anschnittsflächen der Somata war bei Weibchen nur etwa halb so groß wie bei Männchen (W.soz.: $90,25 \pm 2,91 \mu\text{m}^2$ *versus* M.soz.: $190,49 \pm 11,41 \mu\text{m}^2$; $p = 0,0001$). Die Nukleusanschnittsflächen im LMAN sozial aufzogener Weibchen waren ebenfalls nur halb so groß wie die bei sozial aufgezogenen Männchen (W.soz.: $50,26 \pm 2,07 \mu\text{m}^2$ *versus* M.soz.: $95,04 \pm 4,99 \mu\text{m}^2$; $p = 0,0001$; Tabelle 9, Abbildungen 26 A, C; 27 A, C, 28, 29).

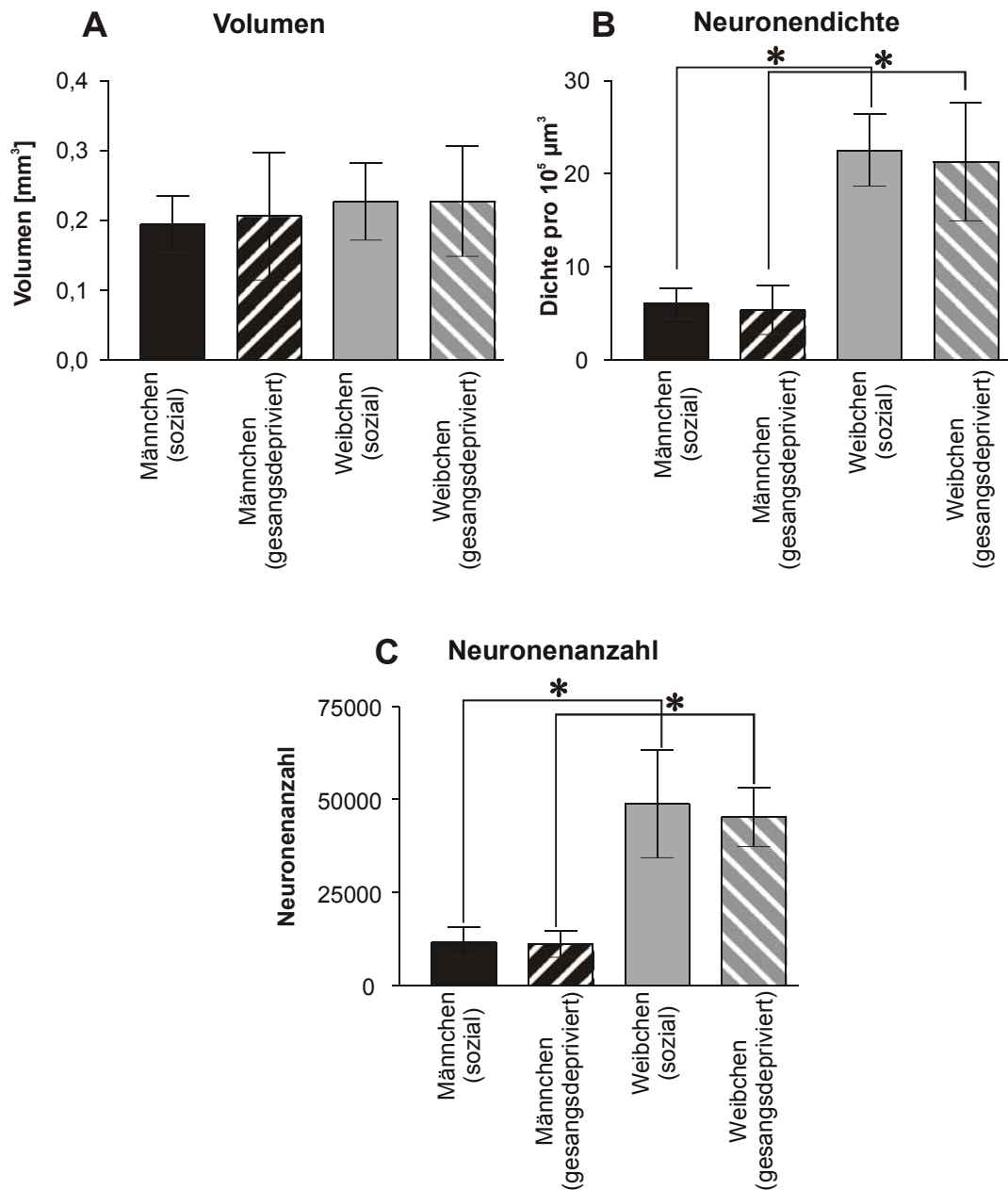


Abb. 28: Vergleich der verschiedenen Aufzuchtgruppen und der Geschlechter bezüglich des LMAN-Volumens (A), der Neuronendichte (B) und der Neuronenanzahl (C) im LMAN anhand der Mittelwerte \pm Standardabweichung pro Gruppe. Sternchen markieren signifikante Unterschiede (schwarz: sozial aufgezogene Zebrafinkenmännchen; schwarz-weiß gestreift: gesangsdepriviert aufgezogene Männchen; grau: sozial aufgezogene Zebrafinkenweibchen; grau-weiß gestreift: gesangsdepriviert aufgezogene Zebrafinkenweibchen).

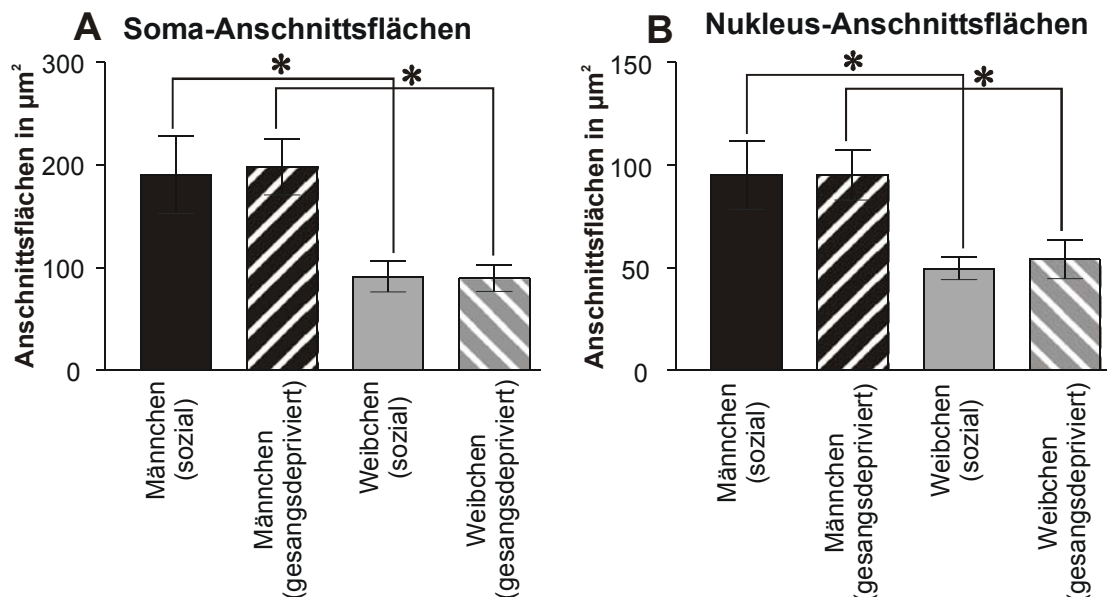


Abb 29: Vergleich der verschiedenen Aufzuchtgruppen und der Geschlechter bezüglich der Somaanschnittsflächen (A) und der Nukleusanschnittsflächen (B) im LMAN anhand der Mittelwerte \pm Standardabweichung pro Gruppe; Sternchen markieren signifikante Unterschiede (schwarz: sozial aufgezogene Zebrafinkenmännchen; schwarz-weiß gestreift: gesangsdepriviert aufgezogene Männchen; grau: sozial aufgezogene Zebrafinkenweibchen; grau-weiß gestreift: gesangsdepriviert aufgezogene Zebrafinkenweibchen).

Der Vergleich zwischen Männchen und Weibchen in der Gruppe der gesangsdepriviert aufgezogenen Tiere ließ gleiche Verhältnisse zwischen den Geschlechtern erkennen wie in der Gruppe der sozial aufgezogenen Tieren. Das LMAN-Volumen gesangsdepriviert aufzogener Weibchen war auch nicht signifikant verschieden vom LMAN-Volumen gesangsdepriviert aufzogener Männchen, während sich die Geschlechter in allen weiteren untersuchten Parametern signifikant unterschieden. Die Neuronendichte gesangsdepriviert aufzogener Weibchen war viermal höher als bei den gesangsdepriviert aufgezogenen Männchen (W.depr.: $21,11 \pm 2,00$ pro $100000 \mu\text{m}^3$ versus M.depr.: $5,87 \pm 0,72$ pro $100000 \mu\text{m}^3$; $p = 0,0004$). Auch die Neuronenanzahl im LMAN bei gesangsdepriviert aufgezogenen Weibchen war viermal größer als bei gesangsdepriviert aufgezogenen Männchen (W.depr.: 45321 ± 2991 versus M.depr.: 11209 ± 1373 ; $p = 0,0001$). Die Somaanschnittsflächen gesangsdepriviert aufzogener Weibchen waren nur halb so groß wie bei den gleichartig aufgezogenen Männchen (W.depr.: $91,98 \pm 4,92 \mu\text{m}^2$ versus M.depr.: $198,02$

$\pm 10,26 \mu\text{m}^2$; $p = 0,0001$). Ebenso verhielt es sich mit den Nukleusanschnittsflächen gesangsdepriviert aufgezogener Weibchen und gesangsdepriviert aufgezogener Männchen (W.depr.: $57,94 \pm 3,37 \mu\text{m}^2$ *versus* M.depr.: $96,45 \pm 4,84 \mu\text{m}^2$; $p = 0,0001$; Tabelle 9 und Abbildungen 26 B ,D; 27 B, D; 28, 29).

3.2.5. Nucleus robustus arcopallii (RA)

Das im *Arcopallium* gelegene Gesangsareal RA ist sowohl in die Projektionen der anterioren Vorderhirnschleife als auch in die Projektionen der prämotorischen Bahn eingebunden. Innerhalb des Projektionsverlaufs der AFP wird der RA vom LMAN innerviert.

3.2.5.1. Folgen gesangsdeprivierter Aufzucht im RA

Im RA wurde innerhalb der Gruppe der Männchen beim Vergleich der verschiedenen Aufzuchtgruppen ausschließlich bei der Neuronendichte ein signifikanter Unterschied gemessen. Die Neuronendichte gesangsdepriviert aufgezogener Männchen war um 37 % größer als die der sozial aufgezogenen Männchen (M.so.: $5,11 \pm 1,44$ pro $100000 \mu\text{m}^3$ versus M.depr.: $7,00 \pm 2,07$ pro $100000 \mu\text{m}^3$; $p = 0,03$). Bezüglich des RA-Volumens, der Neuronenanzahl und der Größe der Anschnittsflächen von Somata und Nuklei wurden im RA bei Männchen keine Veränderungen nach gesangsdeprivierter Aufzucht beobachtet (Tabelle 10 und Abbildungen 30 A, B; 31 A, B; 32, 33).

	MÄNNCHEN		WEIBCHEN	
	sozial	depriviert	sozial	depriviert
Gesangsareal-volumen (mm^3)	$0,31 \pm 0,04$ N = 12	$0,29 \pm 0,08$ N = 7	$0,04 \pm 0,02$ N = 6	$0,02 \pm 0,01$ N = 7
Neuronendichte ($10^5 \mu\text{m}^3$)	$5,11 \pm 1,44$ N = 12	$7,00 \pm 2,07$ N = 7	$4,86 \pm 1,49$ N = 7	$6,03 \pm 1,27$ N = 7
Neuronenanzahl	15675 ± 5130 N = 12	19476 ± 5438 N = 7	8609 ± 3836 N = 6	5071 ± 2248 N = 7
Somaanschnitts-flächen (μm^2)	$135,44 \pm 8,90$ N = 12	$138,96 \pm 12,72$ N = 7	$80,71 \pm 14,95$ N = 7	$63,71 \pm 8,81$ N = 7
Nukleusanschnitts-flächen (μm^2)	$73,73 \pm 6,24$ N = 12	$75,56 \pm 9,33$ N = 7	$47,47 \pm 8,32$ N = 7	$37,45 \pm 5,59$ N = 7

Tab. 10: Die Ergebnisse der Untersuchungsparameter: Volumen, Neuronendichte, Neuronenanzahl, Somaanschnittsflächen und Nukleusanschnittsflächen des Gehirnareals RA sind in Form von Mittelwert \pm Standardabweichung zusammengefasst; N: Anzahl der Tiere.

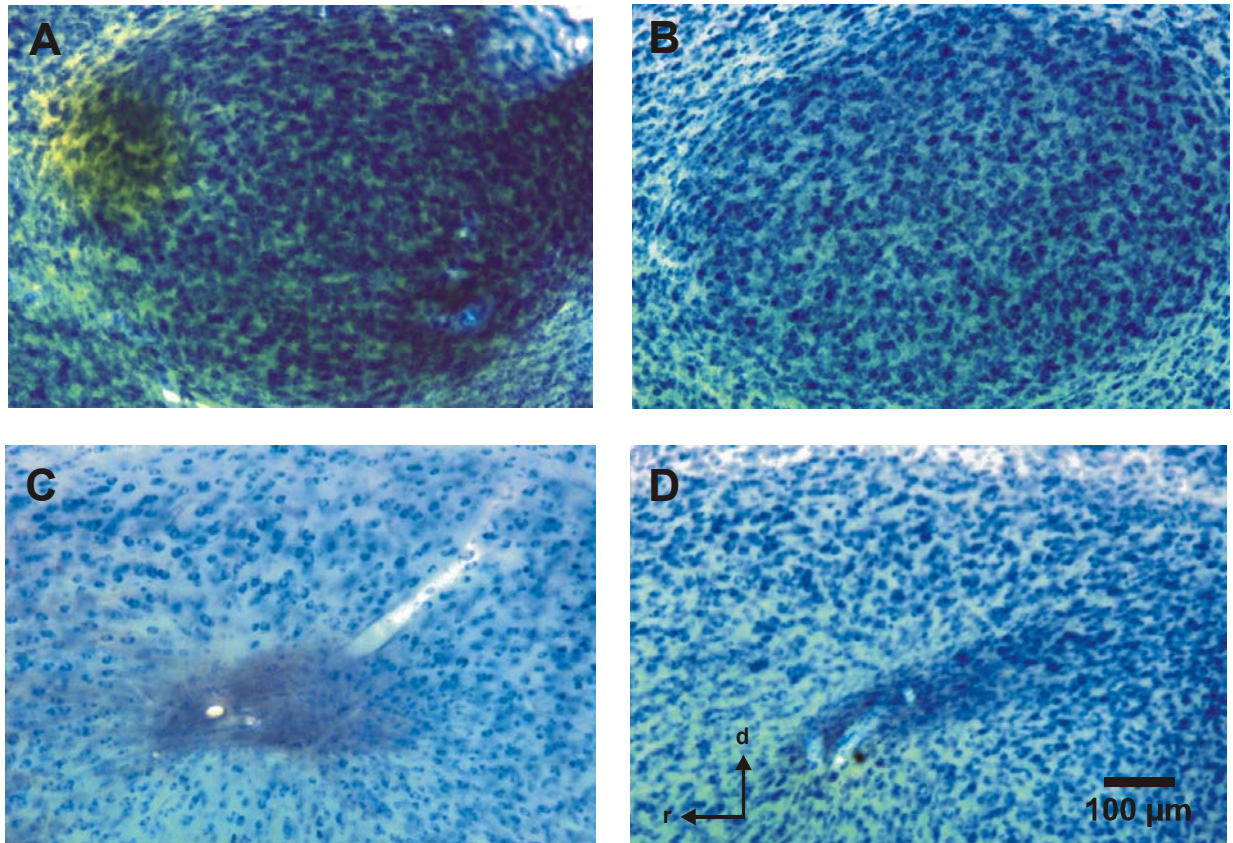


Abb. 30: Lichtmikroskopische Aufnahmen 100 μm dicker, Nissl-gefärbter Sagittalschnitte zeigen RA-Volumenanschnittsflächen adulter sozial (A) und gesangsdepriviert (B) aufzogener Zebrafinkenmännchen und adulter sozial (C) und gesangsdepriviert (D) aufzogener Zebrafinkenweibchen. Aus Serienschnitten dieser Volumenanschnittsflächen wurden die RA-Volumina (der jeweiligen Untersuchungsgruppen) bestimmt. Das RA-Volumen sozial aufzogener Zebrafinkenmännchen war größer als das RA-Volumen sozial aufzogener wie auch gesangsdepriviert aufzogener Zebrafinkenweibchen. Innerhalb der Zebrafinkenweibchen war das RA-Volumen sozial aufzogener Zebrafinkenweibchen signifikant größer als das der gesangsdepriviert aufgezogenen Zebrafinkenweibchen (Abkürzungen: d: dorsal, r: rostral).

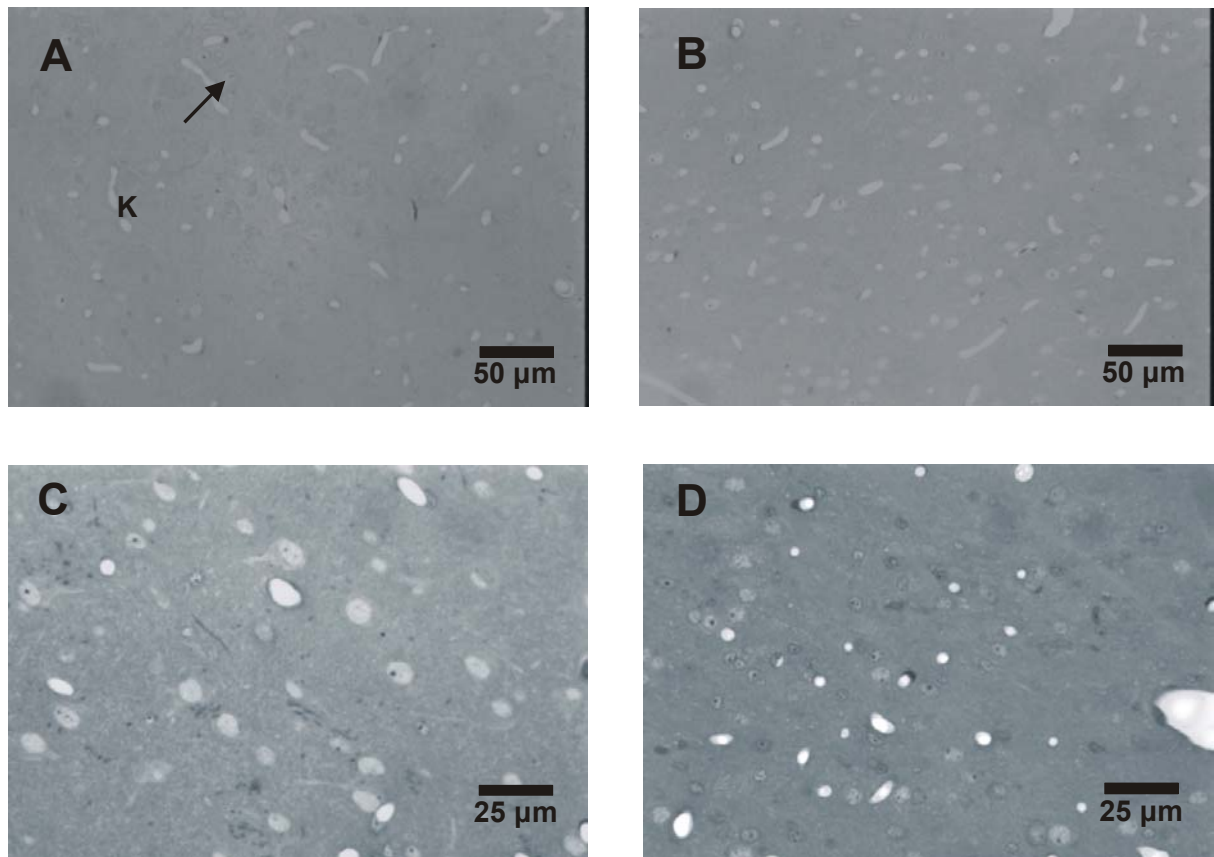


Abb. 31: Vergleich der Zellgröße und Zelldichte im RA adulter sozial (A) und gesangsdepriviert (B) aufzogener Zebrafinkenmännchen und adulter sozial (C) und gesangsdepriviert (D) aufzogener Zebrafinkenweibchen anhand lichtmikroskopischer Aufnahmen von Semidünnschnitten (Schnittdicke: 1 µm; K: Blutkapillare, Pfeil markiert die Anschnittsfläche eines Nukleus mit Nukleolus). Bei den gesangsdepriviert aufgezogenen Zebrafinkenmännchen war die Zelldichte im RA signifikant höher als bei den sozial aufgezogenen Zebrafinkenmännchen. Bei den Zebrafinkenweibchen war die Zellgröße der gesangsdepriviert aufgezogenen Tiere signifikant kleiner als bei den sozial aufgezogenen Tieren.

Bei den Weibchen wurden im RA bezüglich aller Untersuchungsparameter Veränderungen nach gesangsdeprivierter Aufzucht beobachtet. Das RA-Volumen gesangsdepriviert aufzogener Weibchen war nur halb so groß wie das RA-Volumen sozial aufzogener Weibchen (W.depr.: $0,02 \pm 0,01 \text{ mm}^3$ versus W.soz.: $0,04 \pm 0,02 \text{ mm}^3$; $p = 0,01$). Ebenso gab es bei den Soma- und Nukleusanschnittsflächen signifikante Unterschiede. Die Somaanschnittsflächen gesangsdepriviert aufzogener Weibchen waren um 21 % kleiner als die der sozial aufgezogenen Weibchen (W.depr.: $63,71 \pm 8,81 \text{ µm}^2$ versus W.soz.: $80,71 \pm 14,95 \text{ µm}^2$; $p = 0,0001$), und die

Nukleusanschnittsflächen gesangsdepriviert aufgezogener Weibchen waren ebenso um 21 % kleiner als die sozial aufgezogener Weibchen (W.depr.: $37,45 \pm 5,59 \mu\text{m}^2$ *versus* W.soz.: $47,47 \pm 8,32 \mu\text{m}^2$; $p = 0,0001$).

Die Neuronendichte war im RA der gesangsdepriviert aufgezogenen Weibchen um 19 % höher als die der sozial aufgezogenen Tiere, unterschied sich aber nicht signifikant von diesen (W.depr.: $6,03 \pm 1,27$ pro $100000 \mu\text{m}^3$ *versus* W.soz.: $4,86 \pm 1,49$ pro $100000 \mu\text{m}^3$; $p = 0,141$). Bei der Berechnung der Neuronenanzahl wurden im Mittel 41 % mehr Neurone im RA der sozial aufgezogenen Weibchen registriert als bei den gesangsdepriviert aufgezogenen Weibchen (W.soz.: 8609 ± 1566 *versus* W.depr.: 5071 ± 850 ; $p = 0,063$). Dennoch wurde kein signifikanter Unterschied ermittelt, vermutlich aufgrund der hohen individuellen Variabilität - vor allem in der Gruppe der gesangsdeprivierten Tiere (Tabelle 10 und Abbildung 30 C, D; 31 C, D; 32, 33).

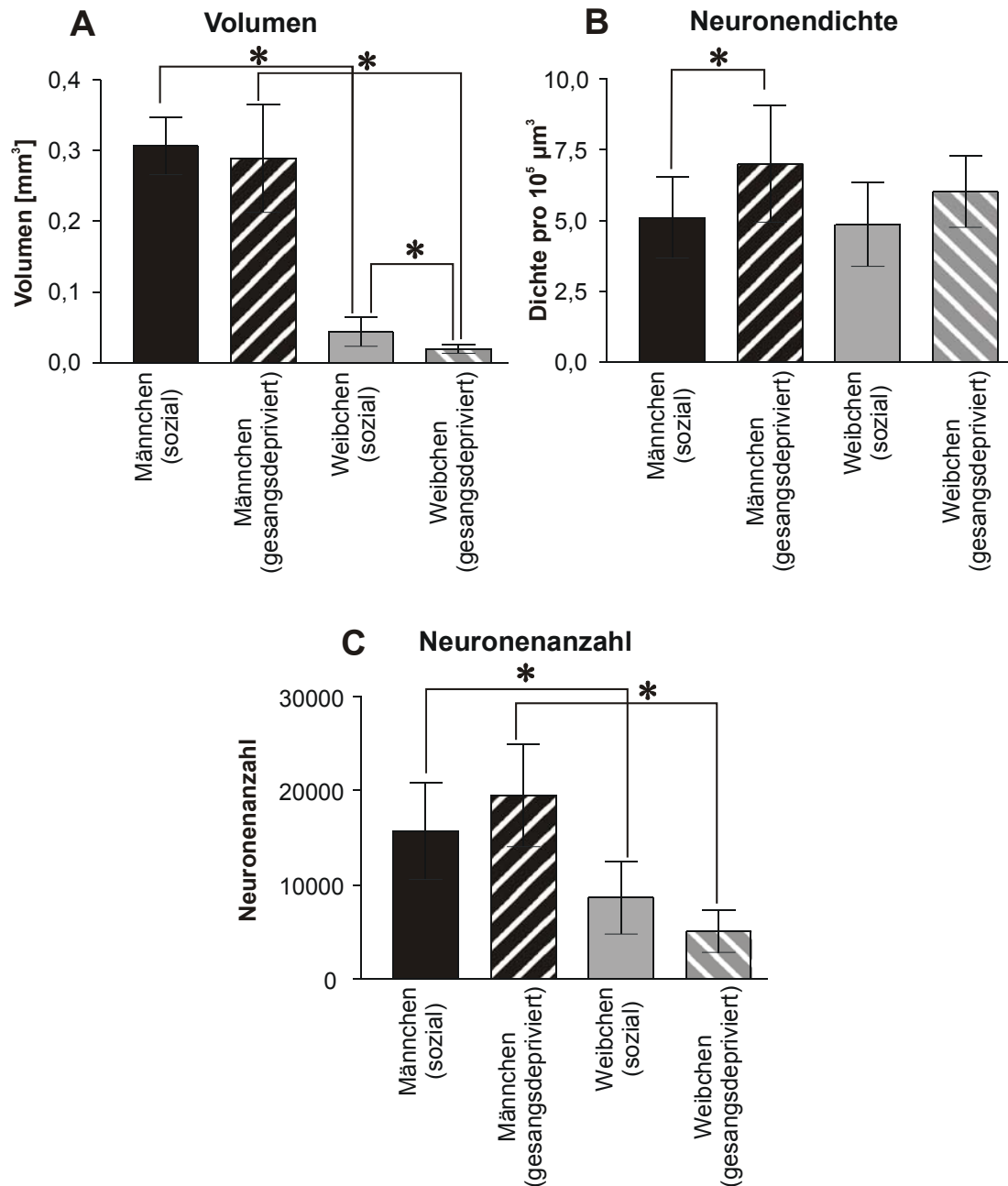


Abb. 32: Vergleich der verschiedenen Aufzuchtgruppen und der Geschlechter bezüglich des RA-Volumens (A), der Neuronendichte (B) und der Neuronenanzahl (C) im RA anhand der Mittelwerte \pm Standardabweichung pro Gruppe; Sternchen markieren signifikante Unterschiede (schwarz: sozial aufgezogene Zebrafinkenmännchen; schwarz-weiß gestreift: gesangsdepriviert aufgezogene Männchen; grau: sozial aufgezogene Zebrafinkenweibchen; grau-weiß gestreift: gesangsdepriviert aufgezogene Zebrafinkenweibchen).

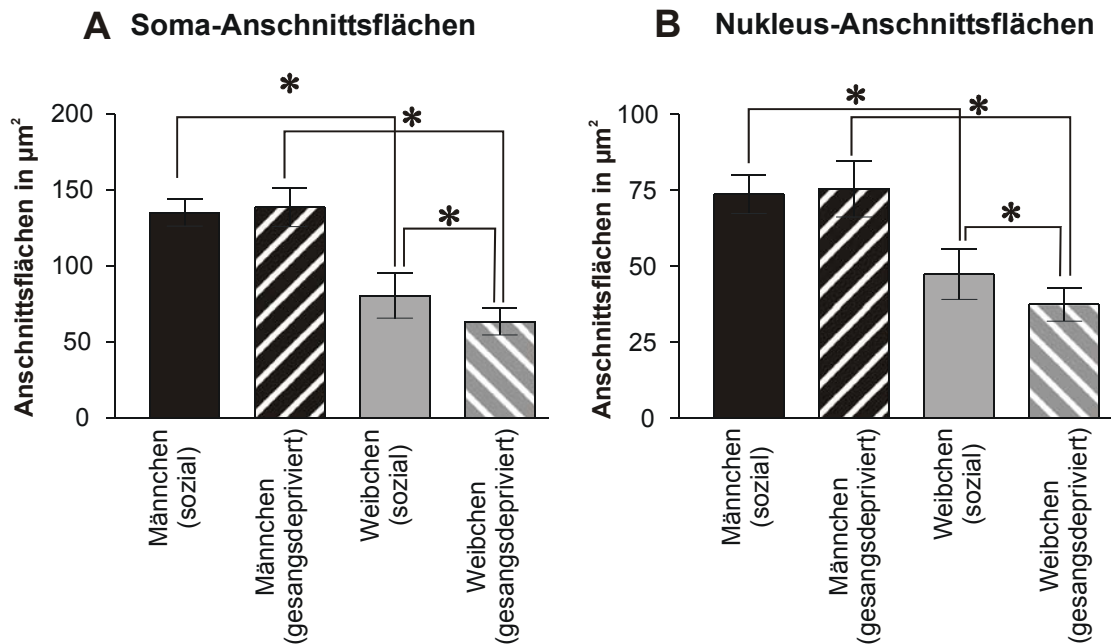


Abb. 33: Vergleich der verschiedenen Aufzuchtgruppen und der Geschlechter bezüglich der Somaanschnittsflächen (A) und der Nukleusanschnittsflächen (B) im RA anhand der Mittelwerte \pm Standardabweichung pro Gruppe. Sternchen markieren signifikante Unterschiede (schwarz: sozial aufgezogene Zebrafinkenmännchen; schwarz-weiß gestreift: gesangsdepriviert aufgezogene Männchen; grau: sozial aufgezogene Zebrafinkenweibchen; grau-weiß gestreift: gesangsdepriviert aufgezogene Zebrafinkenweibchen).

3.2.5.2. Geschlechtsspezifische Untersuchungen im RA

Der Vergleich zwischen Männchen und Weibchen zeigte sowohl bei den sozial wie auch bei den gesangsdepriviert aufgezogenen Tieren ein stark sexualdimorph geprägtes Verhältnis. In der Gruppe der sozial aufgezogenen Tiere betrug das RA-Volumen der Weibchen nur 13 % des RA-Volumens der sozial aufgezogenen Männchen (W.so.: $0,04 \pm 0,02 \text{ mm}^3$ versus M.so.: $0,31 \pm 0,04 \text{ mm}^3$; $p = 0,0001$), und in der Gruppe der gesangsdepriviert aufgezogenen Tiere betrug das RA-Volumen der Weibchen nur 7 % des RA-Volumens der Männchen (W.depr.: $0,02 \pm 0,01 \text{ mm}^3$ versus M.depr.: $0,29 \pm 0,08 \text{ mm}^3$; $p = 0,00001$; Abbildung 30, 32, 33).

Die Neuronenanzahl im RA war bei den sozial aufgezogenen Weibchen nur etwa halb so hoch wie bei den sozial aufgezogenen Männchen (W.soz.: 8609 ± 3836 *versus* M.soz.: 15675 ± 5130 ; $p = 0,01$). Bei den gesangsdepriviert aufgezogenen Tieren war die Neuronenanzahl bei den Weibchen sogar ungefähr nur ein Viertel so hoch wie bei den Männchen (W.depr.: 5071 ± 2248 *versus* M.depr.: 19476 ± 5438 ; $p = 0,0001$). Die Somaanschnittsflächen im RA bei sozial aufgezogenen Weibchen waren um 40 % kleiner als bei gleich aufgezogenen Männchen (W.soz.: $80,71 \pm 14,95 \mu\text{m}^2$ *versus* M.soz.: $135,44 \pm 8,90 \mu\text{m}^2$; $p = 0,0001$). Die Somaanschnittsflächen der gesangsdepriviert aufgezogenen Weibchen waren 54 % kleiner als die der gesangsdepriviert aufgezogenen Männchen (W.depr.: $63,71 \pm 8,81 \mu\text{m}^2$ *versus* M.depr.: $138,96 \pm 12,72 \mu\text{m}^2$; $p = 0,0001$). Die Nukleusanschnittsflächen im RA der sozial aufgezogenen Weibchen waren 36 % kleiner als die der gleichermaßen aufgezogenen Männchen (W.soz.: $47,47 \pm 8,32 \mu\text{m}^2$ *versus* M.soz.: $73,73 \pm 6,24 \mu\text{m}^2$; $p = 0,0001$). Ähnlich verhielt es sich mit der Größe der Nukleusanschnittsflächen gesangsdepriviert aufzogener Weibchen, die nur halb so groß waren wie die der gesangsdepriviert aufgezogenen Männchen (W.depr.: $37,45 \pm 5,59 \mu\text{m}^2$ *versus* M.depr.: $75,56 \pm 9,33 \mu\text{m}^2$; $p = 0,0001$). Die einzige Abweichung von diesem sexualdimorphen Verhältnis trat beim Vergleich der Neuronendichte auf: Hier gab es weder in der Gruppe der sozial aufgezogenen Tiere noch in der der gesangsdepriviert aufgezogenen Tiere signifikante Unterschiede zwischen Männchen und Weibchen (Tabelle 10 und Abbildungen 30, 31, 32, 33).

3.2.6. Zusammenfassung der Ergebnisse der morphometrischen Studie

Im Rahmen der morphometrischen Studie wurden die Gesangsareale der AFP bezüglich ihrer Volumenausbildung, ihrer Neuronendichte, ihrer Neuronenanzahl und ihrer Neuronengröße innerhalb dieser Areale untersucht. Signifikante Unterschiede, die beim Vergleich zwischen unterschiedlich aufgezogenen Tieren des gleichen Geschlechts und beim Vergleich zwischen gleichermaßen aufgezogenen Männchen und Weibchen ermittelt wurden, sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

		Gesangs- areal- volumen	Neuronen- dichte	Neuronen- anzahl	Somaan- schnitts- flächen	Nukleusan- schnitts- flächen
HVC						
Aufzucht	M.soz. - M.depr.	*	ns	ns	ns	ns
	W.soz. - W.depr.	ns	ns	ns	ns	ns
Geschlecht	M.soz. - W.soz.	***	**	***	**	**
	M.depr. - W.depr.	***	**	***	**	ns
Area-X						
Aufzucht	M.soz. - M.depr.	ns	-	-	-	-
DLM						
Aufzucht	M.soz. - M.depr.	*	-	-	-	-
	W.soz. - W.depr.	ns	-	-	-	-
Geschlecht	M.soz. - W.soz.	ns	-	-	-	-
	M.depr. - W.depr.	ns	-	-	-	-
LMAN						
Aufzucht	M.soz. - M.depr.	ns	ns	ns	ns	ns
	W.soz. - W.depr.	ns	ns	ns	ns	ns
Geschlecht	M.soz. - W.soz.	ns	***	***	***	***
	M.depr. - W.depr.	ns	***	***	***	***
RA						
Aufzucht	M.soz. - M.depr.	ns	*	ns	ns	ns
	W.soz. - W.depr.	*	ns	ns	*	*
Geschlecht	M.soz. - W.soz.	***	ns	**	***	***
	M.depr. - W.depr.	***	ns	***	***	***

Tab. 11: Zusammenfassung der Ergebnisse. Verglichen werden die Einflüsse von Geschlecht und Aufzuchtbedingungen auf die morphometrischen Parameter in den verschiedenen Hirnarealen (*: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$, ns: $p > 0,05$, nicht signifikant).

3.2.6.1. Folgen gesangsdeprivierter Aufzucht

Innerhalb der einzelnen Gesangsareale wurden folgende signifikante Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Aufzuchtgruppen beobachtet:

Im HVC und DLM von Männchen hatte die gesangsdeprivierte Aufzucht signifikante Veränderungen bezüglich des Arealvolumens zur Folge. Das HVC-Volumen gesangsdepriviert aufgezogener Männchen war 22 % kleiner als das sozial aufgezogener Tiere, während das DLM-Volumen gesangsdepriviert aufgezogener Männchen 60 % größer war als bei sozial aufgezogenen Männchen. Auf das Volumen der Gesangsareale Area-X, LMAN und RA der Männchen hatte die gesangsdeprivierte Aufzucht keinen Einfluss. Des Weiteren wurden bei Männchen im RA Folgen gesangsdeprivierter Aufzucht beobachtet. Hier war bei gesangsdepriviert aufgezogenen Männchen die Neuronendichte 37 % höher als im RA sozial aufgezogener Männchen.

Bei den Weibchen wurden Folgen gesangsdeprivierter Aufzucht ausschließlich im Gesangsareal RA beobachtet. Das RA-Volumen gesangsdepriviert aufgezogener Weibchen war nur halb so groß wie das RA-Volumen sozial aufgezogener Tiere. Des Weiteren waren sowohl die Soma- als auch die Nukleusanschnittsflächen im RA gesangsdepriviert aufgezogener Weibchen 21 % kleiner als die der sozial aufgezogenen Weibchen (Tabelle 12).

	Gesangsareal- volumen (mm ³)	Neuronendichte (x10 ⁵ µm ⁻³)	Neuronenzahl pro Gesangsareal	Somaan- schnittsflächen (µm ²)	Nukleusan- schnittsflächen (µm ²)
HVC					
M.so. <-> M.depr.	0,42 ± 0,08 <-> 0,33 ± 0,05 p = 0,015	22,33 ± 5,26 <-> 19,68 ± 5,09 ns	82475 ± 23461 <-> 63963 ± 16544 ns	99,40 ± 11,01 <-> 107,55 ± 9,85 ns	57,70 ± 5,91 <-> 58,41 ± 6,72 ns
W.so. <-> W.depr.	0,06 ± 0,03 <-> 0,05 ± 0,02 ns	12,71 ± 4,64 <-> 9,84 ± 4,01 ns	7308 ± 3180 <-> 4317 ± 1921 ns	79,30 ± 10,62 <-> 87,60 ± 13,96 ns	47,87 ± 8,86 <-> 55,35 ± 9,43 ns
Area-X					
M.so. <-> M.depr.	1,36 ± 0,04 <-> 1,30 ± 0,09 ns	-	-	-	-
W.so. <-> W.depr.	-	-	-	-	-
DLM					
M.so. <-> M.depr.	0,1 ± 0,04 <-> 0,16 ± 0,05 p = 0,0424	-	-	-	-
W.so. <-> W.depr.	0,14 <-> 0,14 ± 0,04 ns	-	-	-	-
LMAN					
M.so. <-> M.depr.	0,20 ± 0,04 <-> 0,21 ± 0,09 ns	6,16 ± 1,63 <-> 5,87 ± 2,62 ns	11663 ± 3988 <-> 11209 ± 3632 ns	190,49 ± 37,84 <-> 198,02 ± 27,15 ns	95,04 ± 16,56 <-> 96,45 ± 12,36 ns
W.so. <-> W.depr.	0,23 ± 0,06 <-> 0,23 ± 0,08 ns	22,48 ± 3,86 <-> 21,11 ± 6,33 ns	48796 ± 14475 <-> 45321 ± 7914 ns	90,25 ± 14,75 <-> 91,98 ± 13,19 ns	50,26 ± 5,43 <-> 57,94 ± 9,30 ns
RA					
M.so. <-> M.depr.	0,31 ± 0,04 <-> 0,29 ± 0,08 ns	5,11 ± 1,44 <-> 7,00 ± 2,07 p = 0,030	15675 ± 5130 <-> 19476 ± 5438 ns	135,44 ± 8,90 <-> 138,96 ± 12,72 ns	73,73 ± 6,24 <-> 75,56 ± 9,33 ns
W.so. <-> W.depr.	0,04 ± 0,02 <-> 0,02 ± 0,01 p = 0,014	4,86 ± 1,49 <-> 6,03 ± 1,27 ns	8609 ± 3836 <-> 5071 ± 2248 ns	80,71 ± 14,95 <-> 63,71 ± 8,81 p = 0,023	47,47 ± 8,32 <-> 37,45 ± 5,59 p = 0,021

Tab. 12: Vergleich gesangsdepriviert aufgezogener Tiere mit sozial aufgezogenen Tieren des selben Geschlechts, bezüglich der Gesangsarealvolumen, der Neuronendichte, der Neuronenzahl, der Soma- und Nukleusanschnittsflächen der Gesangsareale HVC, Area-X, DLM, LMAN und RA. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung.

3.2.6.2. Geschlechtsspezifische Unterschiede

Im Gesangsareal HVC wurden in der Gruppe der sozial aufgezogenen Tiere bezüglich aller untersuchten Parameter geschlechtsspezifische Unterschiede ermittelt. In der Gruppe der gesangsdepriviert aufgezogenen Tiere wurden, mit Ausnahme der Nukleusanschnittsflächen, geschlechtsspezifische Unterschiede ermittelt. Hierbei galt, dass bei Weibchen die verschiedenen Parameter jeweils kleiner beziehungsweise geringer ausgebildet waren als bei Männchen. Das HVC-Volumen betrug in beiden Aufzuchtgruppen bei Weibchen nur etwa 15 % des HVC-Volumens der Männchen. Die Neuronendichte im HVC war bei sozial aufgezogenen Weibchen 37 % und bei gesangsdepriviert aufgezogenen Weibchen 50 % kleiner als bei den gleichartig aufgezogenen Männchen. Die Neuronenanzahl im HVC der Weibchen betrug in beiden Aufzuchtgruppen nur etwa ein Zehntel der Neuronenanzahl im HVC der Männchen. Die Somaanschnittsflächen sozial und gesangsdepriviert aufzogener Weibchen waren ungefähr 20 % kleiner als die der gleichartig aufgezogenen Männchen. Auch die Nukleusanschnittsflächen sozial aufzogener Weibchen waren etwa 20 % kleiner als die der Männchen, während es bezüglich der Nukleusanschnittsflächen zwischen gesangsdepriviert aufgezogenen Männchen und Weibchen keinen signifikanten Unterschied gab (Tabelle 13).

Im LMAN waren sowohl in der Gruppe der sozial aufgezogenen als auch in der Gruppe der gesangsdepriviert aufgezogenen Tiere bei den Weibchen die Neuronendichte und die Neuronenanzahl viermal höher und die Soma- und Nukleusanschnittsflächen um die Hälfte kleiner ausgebildet als bei den Männchen (Tabelle 13).

Auch im RA waren die geschlechtsspezifischen Unterschiede bei den sozial und den gesangsdepriviert aufgezogenen Tieren gleich ausgebildet. Das Volumen, die Neuronenanzahl und die Soma- und Nukleusanschnittsflächen waren im RA bei Weibchen signifikant kleiner ausgebildet als bei den Männchen. Das RA-Volumen in beiden Aufzuchtgruppen bei Weibchen betrug nur etwa 10 % des RA-Volumens der Männchen. Die Neuronenanzahl war bei sozial aufgezogenen Tieren bei Weibchen nur etwa halb so hoch wie die Neuronenanzahl im RA der Männchen und bei den gesangsdepriviert aufgezogenen Weibchen nur ein Viertel so hoch wie im RA

gesangsdepriviert aufzogener Männchen. Die Somaanschnittsflächen sozial aufzogener Weibchen waren um 40 % kleiner als bei sozial aufgezogenen Männchen und bei gesangsdepriviert aufgezogenen Weibchen 55 % kleiner als bei gleichermaßen aufgezogenen Männchen. Die Nukleusanschnittsflächen sozial aufzogener Weibchen waren 36 % und die gesangsdepriviert aufzogener Weibchen waren 50 % kleiner als die Nukleusanschnittsflächen der jeweils gleichermaßen aufgezogenen Männchen (Tabelle 13).

	Gesangsareal- volumen (mm ³)	Neuronendichte (x10 ⁵ µm ³)	Neuronenanzahl pro Gesangsareal	Somaan- schnittsflächen (µm ²)	Nukleusan- schnittsflächen (µm ²)
HVC					
M.so. <-> W.so.	0,42 ± 0,08 <-> 0,06 ± 0,03 p = 0,0001	20,33 ± 5,30 <-> 12,71 ± 4,64 p = 0,0056	82475 ± 23461 <-> 7308 ± 3180 p = 0,0001	99,40 ± 11,01 <-> 79,30 ± 10,62 p = 0,0012	57,70 ± 5,91 <-> 47,87 ± 8,86 p = 0,0097
M.depr. <-> W.depr.	0,33 ± 0,05 <-> 0,05 ± 0,02 p = 0,0001	19,68 ± 5,09 <-> 12,71 ± 4,01 p = 0,0017	63963 ± 16544 <-> 4317 ± 1921 p = 0,0001	107,55 ± 9,85 <-> 87,60 ± 13,96 p = 0,0093	58,41 ± 6,72 <-> 55,35 ± 9,43 ns
LMAN					
M.so. <-> W.so.	0,20 ± 0,04 <-> 0,23 ± 0,06 ns	6,16 ± 1,63 <-> 22,48 ± 3,86 p = 0,0001	11663 ± 3988 <-> 48796 ± 14475 p = 0,0001	190,49 ± 37,84 <-> 90,25 ± 14,75 p = 0,0001	95,04 ± 16,56 <-> 50,26 ± 5,43 p = 0,0001
M.depr. <-> W.depr.	0,21 ± 0,09 <-> 0,23 ± 0,08 ns	5,87 ± 2,62 <-> 21,11 ± 6,33 p = 0,0004	11209 ± 3632 <-> 45321 ± 7914 p = 0,0001	198,02 ± 27,15 <-> 91,98 ± 13,19 p = 0,0001	96,45 ± 12,36 <-> 57,94 ± 9,30 p = 0,0001
RA					
M.so. <-> W.so.	0,31 ± 0,04 <-> 0,04 ± 0,02 p = 0,0001	5,11 ± 1,44 <-> 4,86 ± 1,49 ns	15675 ± 5130 <-> 8609 ± 3836 p = 0,0091	135,44 ± 8,90 <-> 80,71 ± 14,95 p = 0,0001	73,73 ± 6,24 <-> 47,47 ± 8,32 p = 0,0001
M.depr. <-> W.depr.	0,29 ± 0,08 <-> 0,02 ± 0,01 p = 0,0001	7,00 ± 2,07 <-> 6,03 ± 1,27 ns	19476 ± 5438 <-> 5071 ± 2248 p = 0,0001	138,96 ± 12,72 <-> 63,71 ± 8,81 p = 0,0001	75,56 ± 9,33 <-> 37,45 ± 5,59 p = 0,0001

Tab. 13: Vergleich zwischen gleichermaßen aufgezogenen Zebrafinkenmännchen und -weibchen, bezüglich der Gesangsarealvolumen, der Neuronendichte, der Neuronenanzahl, der Soma- und Nukleusanschnittsflächen der Gesangsareale HVC, LMAN und RA. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung.

4. DISKUSSION

Das zur Steuerung des Gesangserwerbs und der Gesangsproduktion verantwortliche neuronale Gesangssystem ist plastisch und verändert sich während dieser Prozesse in anatomischer, neurochemischer und molekularer Hinsicht (Alvarez-Buylla and Kirn 1997; Clayton 1997; Nordeen and Nordeen 1997). Da bei Zebrafinken nur die Männchen singen lernen, die Weibchen aber nicht, bietet der Vergleich zwischen den Geschlechtern einen geeigneten Untersuchungsansatz für neuronale Korrelate, die mit diesem Gesangserwerb in Verbindung stehen (siehe Abschnitt 4.2.). Einen weiteren Ansatz zur Untersuchung von Gesangslernprozessen bietet die Veränderung der Aufzuchtbedingungen, wie die Gesangsdeprivation (siehe Abschnitt 4.3.).

Für beide Untersuchungsansätze wurden morphologische Parameter, wie das Volumen der Gesangsareale und auf zellulärer Ebene innerhalb dieser Gesangsareale die Größe, Dichte und Anzahl der Neurone, untersucht. Von diesen Untersuchungsparametern ist aus zahlreichen Entwicklungsstudien bekannt, dass sie sich in den Gesangsarealen während der Gesangsentwicklung verändern, und es wird angenommen, dass sie mit Lernprozessen in Zusammenhang stehen (Bottjer et al. 1985; Bottjer et al. 1986; Nordeen and Nordeen 1988a; Kirn and DeVogd 1989; Alvarez-Buylla et al. 1990a; Alvarez-Buylla et al. 1992; Burek et al. 1993; Nixdorf-Bergweiler 1996; Alvarez-Buylla and Kirn 1997; Nordeen and Nordeen 1997; Nixdorf-Bergweiler 1998; Nixdorf-Bergweiler 2001).

Vor der Diskussion der diesbezüglich erhaltenen Ergebnisse werden einige methodische Aspekte diskutiert (siehe Abschnitt 4.1.).

4.1. Methodendiskussion

Bestimmung der neuronalen Dichte und der Gesamtneuronenanzahl

Die Verwendung normaler Zellzählung ist von Fehlern behaftet. Generell kann die Zellzahl nicht direkt im Gewebe bestimmt werden, statt dessen müssen die Zellen anhand von histologischen Schnittpräparaten bestimmt werden. Dazu werden die Profile der Partikel (Zellen oder deren Nukleoli) gezählt. Da jedoch das Profil einer Zelle in mehr als einem Schnitt auftreten kann, muss die Anzahl der gezählten Profile in einen Schätzwert der Zellzahl gewandelt werden. Wie oft ein Partikel als Profil in mehr als einem Schnitt erscheint, hängt von dessen Größe, Gestalt und Orientierung im Schnittpräparat ab (von Bartheld 2002). Eine Möglichkeit, die mehrmalige Zählung des gleichen Objekts zu korrigieren, ist die Verwendung von Korrekturfaktoren (Abercrombie 1946; Hedreen 1998a; Hedreen 1998b). Diese Korrekturfaktoren können allerdings nicht alle systematischen Fehler ausschließen (Hedreen 1998a; Hedreen 1998b).

Neuere und effektivere Methoden zur Zellzählung bieten die Methoden der „Disector-Technik“, die es erlauben, Zellzahlen zu bestimmen, ohne dass dabei systematische Fehler (sogenannte „unbiased estimates“) eine Rolle spielen (Coggeshall 1992; Coggeshall and Lekan 1996; Gundersen et al. 1999). Diese Methoden identifizieren jeden Partikel einzeln, sodass er nur einmal gezählt wird. Dieses Zählverfahren ist durch den Vergleich benachbarter (Semi-) Dünnschnitte möglich und wird als physikalische Disector-Technik bezeichnet, oder durch zufällige Bestimmung der Partikelzahl im dreidimensionalen Raum eines relativ dicken Schnittes, was als optische Disector-Technik bezeichnet wird (Coggeshall 1992; Coggeshall and Lekan 1996). In beiden Methoden der Disector-Technik wird die mittlere Dichte der gezählten Partikel (N_v) auf den gesamten Referenzraum (V_{ref}) angewendet und die Gesamtzahl (N) wird bestimmt als $N = V_{ref} \times N_v$ (Coggeshall 1992; Hedreen 1998a; Hedreen 1998b; West 1999; von Bartheld 2002). Der Vorteil der Disector-Technik besteht darin, dass sie - im Gegensatz zu der konventionellen Zellzählung - theoretisch frei von systematischen Fehlern ist (West 1999; West and Slomanka 2001; von Bartheld 2002). Da bei der optischen Disector-Methode dicke Schnitte verwendet werden und eine spezifische Erweiterung des Mikroskops notwendig ist, die es erlaubt, die Bewegungen in der z-Achse zu registrieren (von Bartheld 2002), wurde in der vorliegenden Arbeit die

physikalische Disector-Technik verwendet (Coggeshall 1992; Coggeshall and Lekan 1996). Ein Nachteil der physikalischen Disector-Technik, im Vergleich zu der optischen Disector-Technik, ist jedoch die langwierige Aufarbeitung zur Erstellung des dünnen Schnittmaterials und die zeitaufwändige Datenerfassung (von Bartheld 2002).

Bestimmung der Neuronengröße

Bei der Untersuchung der Neuronengröße war nicht die absolute Zellgröße von Interesse, sondern der Vergleich zwischen den Geschlechtern beziehungsweise den Aufzuchtgruppen entscheidend. Es wurde nicht das tatsächliche Volumen von Zellen bestimmt, sondern deren Anschnittsflächen zwischen zwei Gruppen verglichen (Bottjer et al. 1986; Akutagawa and Konishi 1994; Tramontin et al. 1998; Nixdorf-Bergweiler 1998). Das Schnittmaterial war einen Mikrometer dick, da so die Anschnittsflächen von Somata, Nuklei und Nukleoli gut sichtbar sind. Um bei allen gemessenen Zellen möglichst die gleiche Schnittebene auszumessen, wurden nur Anschnittsflächen bestimmt, in denen auch der Nukleolus sichtbar war. Eine zuerst durchgeführte Pilotstudie zeigte, dass bei der Auswertung von 50 Anschnittsflächen pro Gesangsareal und Tier die Varianz ausreichend gering war und somit die Stichprobe eine ausreichende Größe hatte.

4.2. Geschlechtsspezifische Unterschiede und Übereinstimmungen

4.2.1. Konnektivitäten des Gesangssystems

Aus dem Verhalten von Zebrafinken ist bekannt, dass, obwohl nur die Männchen singen, beide Geschlechter das arteigene Gesangsmuster im Gedächtnis niedergelegt haben und dass das Gesangsmuster während der juvenilen Entwicklung erlernt werden muss (Miller 1979; Cynx and Nottebohm 1992). Dieser Lernprozess findet bei Männchen und Weibchen während der juvenilen Entwicklung zur gleichen Zeit statt (Miller 1979; Böhner 1990). Wie der Abgleich von Gehörtem mit dem Erlernten stattfindet, ist im Einzelnen noch nicht geklärt. Von den Männchen ist bekannt, dass die AFP eine entscheidende Rolle beim Erkennen von arteigenem Gesang wie auch beim Erkennen des eigenen Gesangs spielt (Doupe and Solis 1997; Margoliash 1997; Scharff et al. 1998; Solis and Doupe 2000). Die AFP könnte als ein morphologisches Korrelat für Gedächtnisbildung angesehen werden, welches auch bei Weibchen für die Niederlegung eines Gesangsmusters im Gedächtnis wichtig sein könnte (Nixdorf-Bergweiler 1996; Scharff et al. 1998; Sellix and Johnson 1999; Luo et al. 2001; Nixdorf-Bergweiler and von Bohlen und Halbach 2005). Zur Untersuchung, ob die Projektionen der AFP bei Männchen und Weibchen gleich verlaufen (Abbildung 34), wurden in dieser Studie die Areale der AFP *in vivo* mit fluoreszenzgekoppelten Dextranaminen markiert und der Farbstofftransport in den Nervenfasern untersucht.

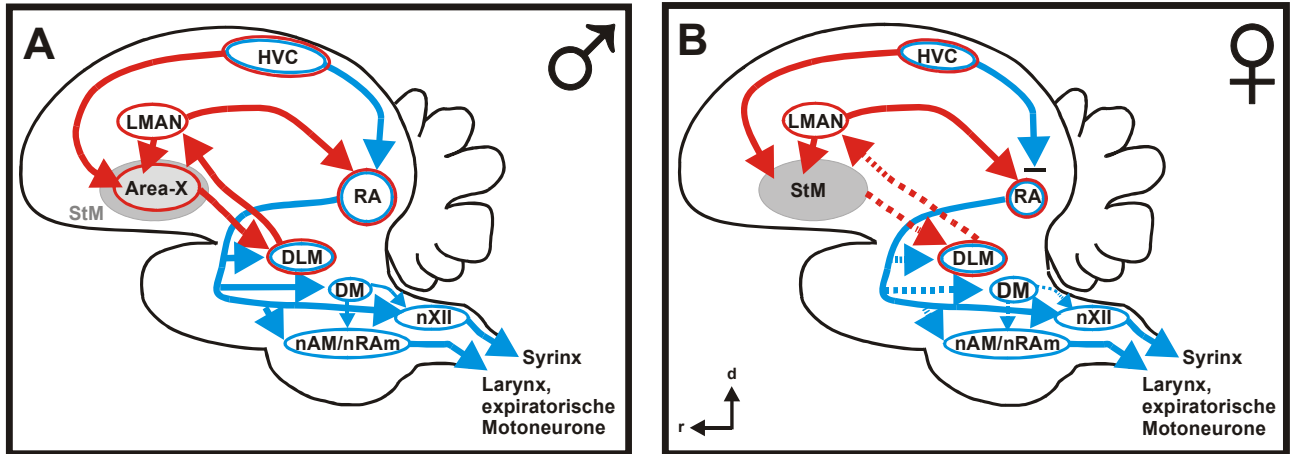


Abb. 34: Schema des Gesangssystems; Sagittalansicht; blau: prämotorische Bahn; rot: AFP, A: Männchen, B: Weibchen; die in B unterbrochen dargestellten Linien stellen Projektionen dar, die bei Weibchen bisher noch nicht nachgewiesen wurden (Abkürzungen: DLM: Nucleus dorsolateralis medialis des anterioren Thalamus, DM: Dorsomedialer Teil des Nucleus intercollicularis, LMAN: Nucleus lateralis magnocellularis nidopallii anterioris, nAM: Nucleus ambiguus, nRAm: Nucleus retroambigualis, nXII: Nucleus nervi hypoglossi, RA: Nucleus robustus arcopallii, StM: Striatum mediale; d: dorsal, r: rostral).

Aus dem Projektionsverlauf der AFP wurden in der vorliegenden Arbeit bei Zebrafinckenweibchen die Projektionen vom StM (in dessen Bereich bei Männchen die Area-X liegt) zum DLM, vom DLM zum LMAN sowie vom LMAN zum StM und vom LMAN zum RA angefärbt. Hierbei ist die Verbindung vom StM in den DLM bei Weibchen zum ersten Mal mittels „Tracing“-Farbstoffen dargestellt worden. Die Verbindung vom DLM zum LMAN war an Weibchen mittels Fasermarkierung bisher nur in einer Studie von Mooney und Rao (1994) untersucht worden, in der offen geblieben war, ob es sich bei den retrograd angefärbten Zellkörpern im Thalamus tatsächlich um die Region des DLM handelte (Mooney and Rao 1994). In der vorliegenden Arbeit konnte diese Verbindung bei sozial und bei gesangsdepriviert aufgezogenen Weibchen im *in vivo* Experiment dargestellt werden.

Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit im *in vivo* Experiment die Projektion vom LMAN in das StM dargestellt, welche auch im *in vitro* Experiment nachgewiesen wurde (Kreck and Nixdorf-Bergweiler 1999, 2005). Die bei Weibchen dargestellte Projektion vom LMAN in den RA stimmt mit Ergebnissen früherer Untersuchungen überein (Nordeen et al. 1992; Mooney and Rao 1994). Zudem konnte der Nachweis erbracht werden, dass

diese Verbindung (vom LMAN in den RA) auch bei gesangsdepriviert aufgezogenen Zebrafinkenweibchen existiert.

Die Untersuchung zur Verschaltung der AFP bei Zebrafinkenmännchen und Zebrafinkenweibchen konnte zeigen, dass die Verbindungen der AFP bei Männchen und Weibchen ähnlich ausgebildet sind (Tabelle 14).

Verbindung	aus Literatur bekannt	in dieser Arbeit nachgewiesen
AFP:		
HVC -> Area-X / StM	M.soz.; W.soz.	M.soz.
Area-X / StM -> DLM	M.soz.	W.soz.*
DLM -> LMAN	M.soz.	M.soz.; W.soz.* , W.depr.*
LMAN -> Area-X / StM	M.soz.; W.soz.	W.soz.
LMAN -> RA	M.soz.; W.soz.	M.soz; W.soz., W.depr.*
prämotorische Bahn:		
HVC -> RA	M.soz.	M.soz.
RA -> DLM	M.soz.	M.soz; W.depr.*
RA -> DM	M.soz.	
RA -> DMP	M.soz.	
RA -> nXII	M.soz.; W.soz.	
RA -> nAM / nRAm	M.soz.	

Tab. 14: Tabellarische Darstellung der mittels „Tracer“-Applikationen angefärbten Projektionen der AFP und der prämotorischen Bahn bei adulten Zebrafinkenmännchen und -weibchen. Sternchen markieren Verbindungen, die in dieser Studie zum ersten Mal an adulten Tieren mittels „Tracer“-Applikationen dargestellt worden sind.

Da die Gesangsareale DLM, HVC und RA jeweils in direktem Kontakt mit der AFP und der prämotorischen Bahn stehen, wurden bei Farbstoffapplikationen in diese Gebiete auch Verbindungen der prämotorischen Bahn angefärbt. Mithilfe der Farbstoffapplikationen konnten bei Männchen die bereits beschriebenen Verbindungen vom HVC zum RA (Nottebohm et al. 1982; Bottjer et al. 1984; Konishi and Akutagawa 1985; Mooney and Rao 1994; Spiro et al. 1999) und vom RA zum DLM (Wild 1993b; Vates et al. 1997) dargestellt werden.

Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass die Verbindung vom RA zum DLM auch bei Weibchen existiert. Durch diese Verbindung gibt es eine weitere rekursive Schleife im Gesangssystem, die vom RA über den DLM und den LMAN zurück zum RA verläuft. Sie verbindet die prämotorische Bahn mit der AFP (Vates et al. 1997). Dieses thalamo-telencephalische Netzwerk ist ähnlich den thalamo-corticalen Verbindungen, die im motorischen System der Säuger auftreten (Karten 1991). Es kann deshalb angenommen werden, dass die Signale, die über diese Verbindungen übermittelt werden, wichtige Funktionen bei der Gesangswahrnehmung, dem Gesangslernen und der Gesangsproduktion haben (Vates et al. 1997). Die Verbindung vom RA zum DLM erscheint bei Männchen überaus wichtig, da sie die einzige Rückkopplung des RA zur AFP darstellt und dazu dient, eine „Efferenz-Kopie“ der Signale zurück zu Gehirnregionen, die am Gesangslernen beteiligt sind, zu übertragen (Wild 1993b). Allerdings erscheint eine Beteiligung bei der Gesangsproduktion nicht der alleinige Aspekt dieser Verbindung zu sein, da sie, wie in der hier dargelegten Arbeit gezeigt, auch bei Weibchen existiert. Interessant wären Untersuchungen dieser Verbindung bei juvenilen Zebrafinken, um zu klären, ob ihr vielleicht eine entscheidende Rolle bei der Gedächtnisniederlegung zukommt, da sie, laut Vates et. al 1997, gehörte Information in das System der AFP einbringt.

4.2.2. Morphologie der Gesangsareale

Die in der hier vorgestellten Arbeit gezeigte Ähnlichkeit im Projektionsverlauf der AFP von Zebrafinkenmännchen und -weibchen gibt Grund zur Annahme, dass die AFP auch bei Zebrafinkenweibchen eine funktionelle Bedeutung hat. Für weiterführende Untersuchungen wurde innerhalb der einzelnen Gesangsareale der AFP nach morphologischen Übereinstimmungen zwischen den Geschlechtern gesucht. Da die AFP bei Männchen beim Erkennen des art eigenen Gesangs eine Rolle spielt (Doupe and Solis 1997; Margoliash 1997; Scharff et al. 1998; Solis and Doupe 2000), könnten bei den morphologischen Untersuchungen der Gesangsareale der AFP ermittelte

Übereinstimmungen zwischen Männchen und Weibchen Hinweise zur Art und zum Ort der Niederlegung des arteigenen Gesangsmusters geben.

Ein Untersuchungsparameter war der Vergleich der Volumina der Gesangsareale. An anderen Systemen und Tierarten gibt es zahlreiche Studien, die die Korrelation von Arealvolumen und einem bestimmten Verhalten nachweisen. So sind Untersuchungen an Säugern, einschließlich des Menschen bekannt, die einen Zusammenhang zwischen der Volumenabnahme des Hippocampus und verminderter Lernleistung nachweisen (Driscoll et al. 2003; Brown et al. 2004) oder aber die verbesserte Lernleistung mit einer Zunahme des Hippocampusvolumens korrelieren (Starkman et al. 2003). Bei Vogelarten, die sich, ähnlich wie Eichhörnchen, Futtervorräte an verschiedenen Orten anlegen, wurden Zusammenhänge zwischen der Hippocampusgröße und räumlichem Lernverhalten nachgewiesen (Clayton 1998; Lee et al. 2001). Singvögel stellen mit ihrer Gesangsproduktion und dem assoziierten Gesangskontrollsystem eines der bekanntesten Modellsysteme zur Untersuchung von Beziehungen zwischen Gehirnnarealvolumen und Verhalten dar (Garamszegi and Eens 2004).

In der hier dargelegten Arbeit bestand bei den vergleichenden Untersuchungen bezüglich der Ausbildung der Gesangsarealvolumina der AFP der auffälligste Unterschied darin, dass das Gesangsareal Area-X bei Weibchen nicht nachweisbar war, ein Sexualdimorphismus, der seit langem bekannt ist (Arnold et al. 1986). Dies erscheint erstaunlich, da das StM, in welchem bei Männchen die Area-X liegt, auch bei Weibchen in den Projektionsverlauf der AFP eingebunden ist (Kreck and Nixdorf-Bergweiler 2005). Der Größenvergleich der Gesangsareale ergab weiterhin, dass die Gehirnnareale HVC und RA bei Weibchen signifikant kleiner ausgebildet waren, während in den Arealen LMAN und DLM keine Volumenunterschiede zwischen den Geschlechtern ermittelt wurden (Abbildung 35). Diese Befunde stehen in Einklang mit früheren Studien (Gurney 1981; Gurney 1982; Arnold et al. 1986; Nixdorf-Bergweiler 1996).

Die Übereinstimmung des LMAN Volumens bei Männchen und Weibchen gab Anlass zur Annahme, dass der LMAN an der früh in der Gesangslernphase stattfindenden Gedächtnisniederlegung des arteigenen Gesangsmusters (ein Lernprozess, der sowohl bei Männchen als auch bei Weibchen stattfindet (Miller 1979; Cynx and Nottebohm 1992; Riebel 2003)) beteiligt sein könnte. Aus früheren Studien ist bekannt, dass die

Entwicklung des LMAN-Volumens während der Ontogenese bei Männchen und Weibchen gleich verläuft (Nixdorf-Bergweiler 1996). Des Weiteren ist bekannt, dass bei Zebrafinkenmännchen der LMAN beim Gesangserwerb während der Jugendentwicklung eine entscheidende Rolle spielt (Mooney and Rao 1994; Wallhäusser-Franke et al. 1995).

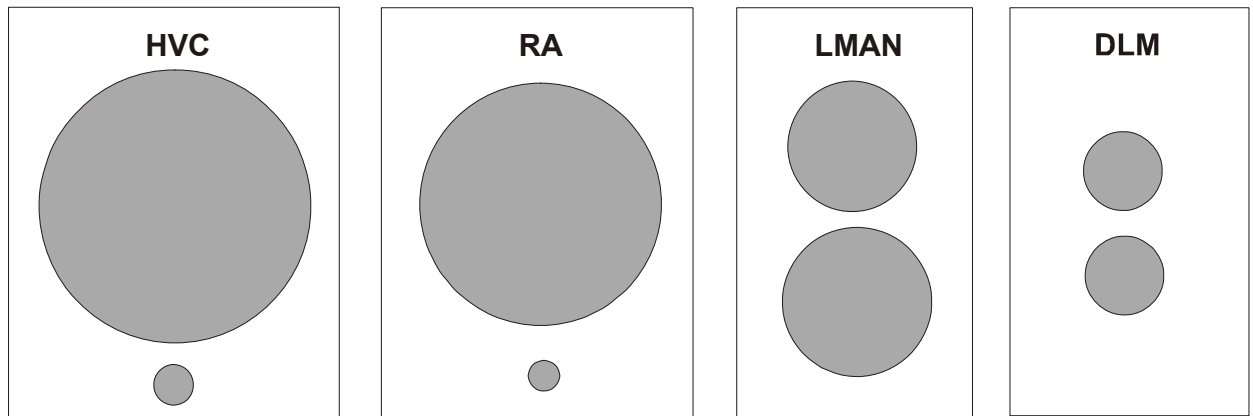


Abb. 35: Schematische Darstellung zur Veranschaulichung der Größenverhältnisse der Gesangsareale HVC, RA, LMAN, DLM (oben: Männchen; unten: Weibchen). Jede graue Fläche ist proportional zum Volumen eines spezifischen Gesangsareals. Das Gesangsareal Area-X ist in diesem schematischen Vergleich nicht dargestellt, da es bei Weibchen nicht nachweisbar ist.

Durch elektrophysiologische Untersuchungen wie induzierte Langzeitpotenzierung (LTP; long term potentiation) konnte gezeigt werden, dass synaptische Plastizität im LMAN auf die frühe Gesangsentwicklungsphase begrenzt ist (Boettiger and Doupe 2001). Da synaptische Plastizität für Lernprozesse notwendig ist, stärken die Befunde der elektrophysiologischen Studie von Boettiger und Doupe 2001 die Hypothese, dass der LMAN nur in der frühen Phase der Gesangsentwicklung eine Rolle spielt. Außerdem weisen Entwicklungsstudien zur Neuronengröße im LMAN auf Übereinstimmungen zwischen Männchen und Weibchen während der frühen Gesangsentwicklungsphase hin (Nixdorf-Bergweiler 1998). Diese Befunde sprechen für eine gleiche Entwicklung des LMAN von Männchen und Weibchen während der Gedächtnisbildung, was die Hypothese zur Schlüsselposition des LMAN bei der Gedächtnisniederlegung des arteigenen Gesangsmusters stützt (Nixdorf-Bergweiler 1998).

Andere Untersuchungen weisen darüber hinaus daraufhin, dass der LMAN nicht nur eine Rolle beim Gesangserwerb spielt (Bottjer et al. 1984; Sohrabji et al. 1990; Scharff and Nottebohm 1991; Wallhäusser-Franke et al. 1995), sondern auch in adulten Zebrafinkenmännchen bei der Diskriminierung zwischen dem eigenen Gesang und dem Gesang eines anderen Zebrafinken (Doupe and Solis 1997; Scharff et al. 1998). Allerdings ist die These zur Beteiligung des LMAN bei der oben genannten Diskriminierung umstritten, da ausschließlich bei anästhesierten Vögeln neuronale Antworten auf den eigenen Gesang (BOS; bird own song) festgestellt werden konnten (Doupe 1997). An wachen Zebrafinkenmännchen konnten keine Antworten auf den BOS im LMAN abgeleitet werden (Doupe and Solis 1997). Auch die Hochregulierung von ZENK beim Hören von arteigenem Gesang bleibt bei wachen Vögeln im LMAN aus (Mello and Clayton 1994; Jarvis and Nottebohm 1997). Die Expression von ZENK wird beispielsweise durch LTP induziert (Cole et al. 1989; Wisden et al. 1990).

In adulten Zebrafinken sind im LMAN, abgesehen vom Volumen (Nixdorf-Bergweiler 1996) und der Anzahl myelinisierter Axone (Nixdorf-Bergweiler and von Bohlen und Halbach 2004), keine weiteren Übereinstimmungen zwischen Männchen und Weibchen bekannt. Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ergaben, dass die Soma- und Nukleusanschnittsflächen im LMAN bei Männchen doppelt so groß sind wie bei den Weibchen, was mit aus der Literatur bekannten Untersuchungen übereinstimmt (Nordeen et al. 1986; Jacobs et al. 1995; Nixdorf-Bergweiler 1998). Dieser Unterschied in der Neuronengröße entwickelt sich ab dem 40. Tag nach dem Schlupf. Danach werden bei Männchen die Zellkörper größer, während sie bei Weibchen schrumpfen. Große Nuklei bei den Männchen könnten auf eine erhöhte rRNA Synthese hinweisen, während die Reduktion der Zellkerngröße bei Weibchen eine Verminderung der Transkriptionsrate und die fehlende Notwendigkeit für eine erhöhte Proteinbiosynthese widerspiegeln könnte (Nixdorf-Bergweiler 1998). Desweiteren sind die Nukleoli im LMAN von Zebrafinkenmännchen signifikant größer als bei Zebrafinkenweibchen (Nixdorf-Bergweiler 1997).

In der hier vorgestellten Arbeit wurden vergleichende Untersuchungen zur Neuronendichte und zur Gesamtneuronenanzahl im LMAN zwischen adulten Männchen und Weibchen durchgeführt. Obgleich das LMAN-Volumen in beiden Geschlechtern gleich groß ausgebildet war und bei Männchen die Neuronen doppelt so groß waren

wie bei Weibchen, waren sowohl die Neuronendichte als auch die Gesamtneuronenanzahl im LMAN bei Weibchen viermal höher als bei Männchen (Nixdorf-Bergweiler and von Bohlen und Halbach 2005). Auffallend war, dass im LMAN die Dichte und Anzahl der Neurone bei Weibchen höher ausgebildet waren als bei Männchen, während in den anderen untersuchten Gesangsarealen sämtliche in dieser Studie untersuchten Parameter bei Weibchen jeweils kleiner ausgebildet waren. Interessanterweise ist trotz der geringeren Gesamtneuronenanzahl im LMAN der Männchen die Anzahl der Projektionsneurone vom LMAN in den RA bei Männchen doppelt so hoch wie bei Weibchen (Nordeen et al. 1992). Die reduzierte Anzahl der Neurone im LMAN der Männchen könnte auf eine Reduktion der Interneurone zurückzuführen sein (Boettiger and Doupe 1998; Nixdorf-Bergweiler and von Bohlen und Halbach 2005). Während der Entwicklung bleibt bei Männchen die Anzahl der Projektionsneurone vom LMAN in den RA erhalten, während sie bei Weibchen reduziert wird (Nordeen et al. 1992). Es könnte angenommen werden, dass die erhöhte Gesamtneuronenanzahl bei Weibchen zu einem Großteil auf einer Erhöhung der Interneurone zurückzuführen ist. Um dies zu verifizieren, wären Untersuchungen mit spezifischen Markern (wie beispielsweise GABA oder Parvalbumin) notwendig.

Die in dieser Arbeit ermittelten geschlechtsspezifischen Unterschiede im LMAN adulter Zebrafinken könnten darauf hinweisen, dass dem LMAN der Zebrafinkenmännchen eine Beteiligung an der Registrierung von Veränderungen im eigenen Gesang - wie zum Beispiel der Gesangsgeschwindigkeit - zugeschrieben werden kann. Diese Hypothese korrespondiert mit einer Studie (Williams and Metha 1999).

Untersuchungen zum Arealvolumen des HVC ergaben, dass das HVC-Volumen der Männchen siebenmal größer ist als das der Weibchen. Diese Befunde stimmen überein mit Ergebnissen früherer Studien (Nottebohm and Arnold 1976; Arnold 1980c; Gurney and Konishi 1980; Bottjer et al. 1985; Nordeen and Nordeen 1989; Nixdorf-Bergweiler 1996). Aus Entwicklungsstudien ist bekannt, dass das HVC-Volumen von zehn Tage alten Zebrafinken noch keine geschlechtsspezifischen Unterschiede aufweist (Kirn and DeVoogd 1989; Nixdorf-Bergweiler 1996). Diese entstehen im Entwicklungsverlauf dadurch, dass bei Männchen zwischen dem 10. und dem 60. postnatalen Tag das HVC-Volumen verdreifacht wird, während es bei Weibchen bis zum 40. Tag rückgebildet wird und dann dem HVC-Volumen adulter Weibchen entspricht (Nixdorf-Bergweiler 1996). Während von Kanarienvögeln bekannt ist, dass die Volumina der

Gesangsareale HVC und RA positiv mit der Komplexität ihres Gesangs korrelieren (Nottebohm et al. 1981), wird bei Zebrafinken kontrovers diskutiert, ob zwischen der Gesangskomplexität und der Zunahme des HVC-Volumens ein Zusammenhang besteht (DeVoogd et al. 1993; MacDougall-Shackleton et al. 1998b; Ward et al. 1998; Airey et al. 2000; Airey and DeVoogd 2000). Neueren Studien an Zebrafinken zufolge wird das HVC-Volumen eher mit der Gesangsaktivität als mit der Gesangskomplexität in Verbindung gebracht (Johnson et al. 2003).

In der hier vorgestellten Arbeit wurden die Neuronendichte und die Neuronenanzahl im HVC adulter Zebrafinkenmännchen und -weibchen ermittelt und miteinander verglichen. Diese Untersuchung ergab, dass neben dem HVC-Volumen auch die Neuronendichte im HVC adulter Männchen signifikant höher ist als bei Weibchen. So war auch die Neuronenanzahl im HVC adulter Männchen höher als bei Weibchen. Dieser Befund stimmt überein mit einer Studie von Nordeen und Nordeen (1989). Dieser Unterschied manifestiert sich bereits zwischen dem 10. und dem 60. Tag der postnatalen Entwicklung (Kirn and DeVoogd 1989). Am Ende dieses Zeitraumes überschneidet sich bei männlichen Zebrafinken die sensorische mit der sensomotorischen Lernphase (Immelmann 1969; Price 1979; Eales 1985). In diesem Zeitraum verdoppelt sich bei Männchen die Neuronenanzahl im HVC, während sie bei Weibchen um die Hälfte reduziert wird (Nordeen and Nordeen 1988a; Kirn and DeVoogd 1989). Bei Weibchen ist die Anzahl pyknotischer Zellen zwischen dem 20. und 40. Lebenstag mehr als doppelt so hoch wie bei Männchen (Kirn and DeVoogd 1989). Während die Neuronenanzahl bei zehntägigen Zebrafinkenmännchen und Zebrafinkenweibchen noch gleich ist, ist sie bei 60-tägigen Männchen siebenmal so hoch wie bei gleichaltrigen Weibchen (Kirn and DeVoogd 1989). Bei adulten Zebrafinkenmännchen konnte, im Vergleich zu adulten Zebrafinkenweibchen, in der vorliegenden Arbeit eine zehnfach höhere Anzahl von HVC-Neuronen ermittelt werden. Diese Veränderung im Verhältnis der HVC-Neurone könnte auf einen weiteren Anstieg der HVC-Neuronenanzahl bei Männchen zwischen dem 60. und 100. Tag hindeuten. Innerhalb dieses Zeitraums erfolgt in der Gesangsentwicklung die Festlegung der Gesangsstruktur (Böhner 1991).

Ergebnisse der hier dargestellten Arbeit erweitern die Erkenntnisse über die zellulären Eigenschaften des HVC bezüglich der Nukleusanschnittsflächen. Vergleichende Untersuchungen ergaben, dass diese bei Männchen signifikant größer ausgebildet sind.

Dies trifft auch auf die Größe der Somaanschnittsflächen zu, was mit Ergebnissen einer früheren Studie übereinstimmt (Nordeen et al. 1987a). Interessanterweise ist der Durchmesser der HVC-Neurone von Männchen im Adultstadium kleiner als mit 40 - 45 Tagen. In dieser Zeit der Entwicklung haben die HVC-Neurone ihren maximalen Durchmesser erreicht (Bottjer et al. 1986; Herrmann and Bischof 1986). Dieser Zeitraum liegt in der sensiblen Phase für Gesangsentwicklung, die etwa bis zum 65. Tag andauert (Immelmann 1969; Price 1979; Eales 1985), beziehungsweise zu Beginn der sensomotorischen Phase, die etwa ab dem 30. Tag beginnt und ungefähr bis zum 100. Tag andauert.

Die sexualdimorphen Befunde im HVC adulter Zebrafinken werden durch eine andere Studie erweitert, in welcher im HVC adulter Zebrafinken ein starker geschlechtsspezifischer Unterschied bezüglich der Myelinisierung der Axone ermittelt wurde (Nixdorf-Bergweiler and von Bohlen und Halbach 2004). Dieser Unterschied wird während der Entwicklung dadurch manifestiert, dass bei Männchen zwischen dem 60. Tag nach dem Schlupf und dem Adultstadium die Myelinisierung der Axone stark zunimmt, während sie bei Weibchen unverändert bleibt (Nixdorf-Bergweiler and von Bohlen und Halbach 2004). Die funktionelle Reife des Gehirns wird mit dem Fortschritt der Myelinisierung sowie der Entwicklung spezifischen Verhaltens in Zusammenhang gesehen (van der Knaap et al. 1991).

Das bei den Untersuchungsparametern der vorliegenden Arbeit durchweg sexualdimorph geprägte Verhältnis des HVC spricht dafür, dass der HVC eine entscheidende Rolle bei der Gesangsproduktion spielt, die nur bei Männchen stattfindet. Diese Annahme entspricht Befunden früherer Studien (Nottebohm et al. 1976; McCasland and Konishi 1981; Simpson and Vicario 1990; Vu et al. 1994).

Ähnlich wie der HVC spielt auch der RA eine entscheidende Rolle bei der Gesangsproduktion der Männchen, während er für die Produktion der angeborenen Lautäußerungen bei Weibchen nicht relevant ist (Simpson and Vicario 1990). Bei Männchen erhält der RA sowohl direkt (über die prämotorische Bahn) als auch indirekt (über die AFP) Signale vom HVC. Bei Weibchen scheint die Innervation des RA hauptsächlich über den LMAN (also über die AFP) zu erfolgen, da die direkte Verbindung vom HVC zum RA bei Weibchen entweder gar nicht (Konishi and

Akutagawa 1985; Mooney and Rao 1994) oder nur in geringem Maße vorhanden zu sein scheint (Wang et al. 1999). Auch die Innervation des RA durch den LMAN ist bei adulten Zebrafinken insofern sexualdimorph ausgebildet, als bei Weibchen deutlich weniger Projektionen vom LMAN in den RA vorhanden sind als bei Männchen (Nordeen et al. 1992). Des Weiteren sind die vom RA ausgehenden Projektionen in den nXII sexualdimorph ausgeprägt, da adulte Männchen eine höhere Zahl dieser Projektionen aufweisen als Weibchen (Johnson and Sellix 2000).

Dieser Sexualdimorphismus ist nicht nur auf die Zahl der Projektionsneurone beschränkt, sondern wird auch beim Vergleich der Neuronenanzahl adulter Tiere im RA deutlich. So ist bei Weibchen die Neuronenanzahl nur etwa halb so hoch wie bei Männchen, was mit Ergebnissen einer früheren Studie übereinstimmt (Gurney 1981). Dieser geschlechtsspezifische Unterschied wird durch die unterschiedlichen Volumina bedingt, die sich schon während der Entwicklung bei juvenilen Männchen und Weibchen dahingehend unterscheiden, dass das RA-Volumen während der Entwicklung bei Weibchen schrumpft und bei Männchen wächst (Bottjer et al. 1985; Konishi and Akutagawa 1985; Bottjer et al. 1986; Nixdorf-Bergweiler 1996). Messungen der hier vorgestellten Arbeit zufolge ist das RA-Volumen adulter Tiere bei Weibchen ungefähr um ein zehnfaches kleiner als bei Männchen. Die Neuronendichte trägt bei der Berechnung der Neuronenanzahl nicht zum geschlechtsspezifischen Unterschied in der Neuronenanzahl adulter Tiere bei, da sich diese zwischen den Geschlechtern nicht signifikant unterscheidet. Dies ist insofern erstaunlich, da bei adulten Männchen der mittlere Somadurchmesser der Neurone doppelt so groß ist wie bei adulten Weibchen. Dieser Unterschied in der Neuronengröße manifestiert sich während der Entwicklung zwischen dem 30. und 45. Tag nach dem Schlupf, denn zu dieser Zeit nimmt bei Weibchen die Neuronengröße im RA ab, während sie bei Männchen zunimmt (Konishi and Akutagawa 1985). Da die Neuronendichte bei Männchen und Weibchen ähnlich ist, die RA-Neurone bei den Männchen aber einen etwa doppelt so großen Somadurchmesser aufweisen, ist anzunehmen, dass bei Männchen eine Reduktion des Neuropils auftritt, die schon während der juvenilen Entwicklung beginnt.

Für die Zunahme des RA-Volumens und der RA-Neuronengröße während der Entwicklung von Zebrafinkenmännchen scheinen Innervationen durch den HVC und den LMAN relevant zu sein, wie durch Läsion des HVC und des LMAN gezeigt werden

konnte (Konishi and Akutagawa 1985; Herrmann and Arnold 1991a; Mooney 1992; Akutagawa and Konishi 1994; Johnson and Bottjer 1994).

Befunde der vorliegenden Arbeit bestätigen den für den RA bekannten Sexualdimorphismus bei adulten Zebrafinken bezüglich des RA-Volumens, der Neuronenanzahl und der Größe der Somataanschnittsflächen. Darüberhinaus werden in dieser Arbeit geschlechtsspezifische Unterschiede bezüglich der Neuronendichte und der Größe der Nukleusanschnittsflächen nachgewiesen. Diese Befunde stehen in Einklang mit der Annahme, dass der RA eine entscheidende Rolle bei der Gesangsproduktion, die nur bei Männchen erfolgt, einnimmt.

4.3. Auswirkungen gesangsdeprivierter Aufzucht

Der Vergleich sozial und gesangsdepriviert aufgezogener Zebrafinken stellt ein etabliertes Modell zur Untersuchung von Lern- und Gedächtnisprozessen und deren physiologischen und morphologischen Korrelaten dar (Eales 1987; Bischof and Herrmann 1988; Herrmann and Arnold 1991a; Herrmann and Arnold 1991b; Rollenhagen and Bischof 1991; Morrison and Nottebohm 1993; Wallhäusser-Franke et al. 1995; Jones et al. 1996; Maekawa 1997; Sakaguchi and Yamaguchi 1997). In der vorliegenden Arbeit wurden Zebrafinkenmännchen und -weibchen gesangsdepriviert aufgezogen, indem ihnen ein geeigneter Tutor zum Erlernen des arttypischen Gesangsmusters vorenthalten wurde. Hierfür wurden Zebrafinkenküken ausschließlich von der Mutter aufgezogen und hatten somit keine Möglichkeit, das arttypische Gesangsmuster zu hören und zu lernen (Eales 1987; Volman and Khanna 1995). Dieser Untersuchungsansatz der gesangsdeprivierten Aufzucht durch Entfernen des Tutors hat gegenüber Versuchen, in denen die Tiere vertäubt oder einzelne Gehirnregionen läsioniert werden, den großen Vorteil, dass keine neurodegenerativen Prozesse durch invasive Maßnahmen ausgelöst werden, die auch die Strukturen anderer nicht läsionierter Gehirngebiete beeinflussen können. Die Auswirkung der gesangsdeprivierten Aufzucht auf das Gesangssystem wurde durch den Vergleich morphometrischer Parameter der Gesangsareale zwischen sozial und gesangsdepriviert aufgezogenen Männchen und Weibchen untersucht. Während morphologische Veränderungen der Gesangsareale nach gesangsdeprivierter Aufzucht bei Zebrafinkenmännchen entweder mit der veränderten Gesangsproduktion und / oder mit dem beeinträchtigten Lernen des Gesangsmusters in Zusammenhang stehen, können bei Zebrafinkenweibchen Veränderungen in der Gesangsmotorik ausgeschlossen werden, da sie lediglich angeborene Kontaktrufe äußern (Simpson and Vicario 1990). Demzufolge könnten morphologische Veränderungen der Gesangsareale bei Zebrafinkenweibchen Hinweise auf Ort und Art der Speicherung des Gesangsmusters geben.

Im Gesangsareal HVC wurde ausschließlich bei gesangsdepriviert aufgezogenen Männchen eine Veränderung bezüglich der hier untersuchten Parameter ermittelt. Untersuchungen dieser Arbeit zeigten, dass gesangsdepriviert aufgezogene Männchen

sich im HVC nur bezüglich des HVC-Volumens signifikant von sozial aufgezogenen Männchen unterschieden, nicht aber in der Neuronendichte oder den Anschnittsflächen der Somata und Nuklei. Da die neuronale Dichte und die Anschnittsflächen der Neurone durch gesangsdeprivierte Aufzucht nicht beeinflusst wurden, könnte diese Volumenänderung des HVC nach gesangsdeprivierter Aufzucht beispielsweise auf eine Erhöhung des Extrazellularraumes oder des Neuropils zurückzuführen sein. Das HVC-Volumen gesangsdepriviert aufzogener Männchen war 22 % kleiner als das sozial aufgezogenen Männchen. Vergleicht man die in dieser Studie erhobenen Daten zum HVC-Volumen adulter gesangsdeprivierter Männchen mit Daten aus einer Entwicklungsstudie sozial aufzogener Tiere (Nixdorf-Bergweiler 1996), fällt auf, dass das HVC-Volumen adulter gesangsdepriviert aufzogener Tiere dem von sozial aufgezogenen Tieren im Alter von etwa 30 bis 40 Tagen gleicht, einem Zeitpunkt in der Entwicklung, zu dem die sensorische Lernphase der Musterniederlegung noch nicht abgeschlossen ist (Böhner 1990) und das motorische Einüben gerade begonnen hat (Nottebohm 1993). Im Vergleich zu adulten sozial aufgezogenen Männchen ist das HVC-Volumen bei 30 bis 40 tägigen juvenilen Zebrafinken ebenfalls um etwa 20 % verringert (Nixdorf-Bergweiler 1996). Die Ähnlichkeit des HVC-Volumens von adulten gesangsdepriviert aufgezogenen Männchen und juvenilen sozial aufwachsenden Männchen könnte darauf hindeuten, dass die Entwicklung des HVC bei den gesangsdepriviert aufgezogenen Männchen verzögert oder unvollständig verläuft. Da der HVC sowohl am Gesangslernen junger Vögel (Nottebohm 1993) als auch an der Gesangsproduktion adulter Tiere beteiligt ist (Nottebohm et al. 1976; McCasland and Konishi 1981; Vu et al. 1994; Kimpo and Doupe 1997; Ward et al. 1998), kann in dieser Studie nicht geklärt werden, ob die Volumenreduktion des HVC bei den gesangsdepriviert aufgezogenen Männchen allein auf die veränderte Gesangsproduktion oder / und auf das eingeschränkte Lernverhalten zurückzuführen ist.

Beim Vergleich der Morphologie des HVC zwischen sozial und gesangsdepriviert aufgezogenen Weibchen ergaben sich bezüglich der hier untersuchten Parameter keine Unterschiede. Diese Ergebnisse stimmen überein mit einer Läsionsstudie, in der die HVC-Läsion adulter Zebrafinkenweibchen keinen Einfluss auf die Fähigkeit hatte, arteigenen von artfremden Gesang unterscheiden zu können (MacDougall-Shackleton et al. 1998a). Da nach gesangsdeprivierter Aufzucht nur bei den Männchen morphologische Veränderungen im HVC ermittelt wurden, bei den Weibchen jedoch

nicht, bestärken diese Ergebnisse die Hypothese, dass der HVC beim Erlernen der Gesangsproduktion (Nottebohm 1993) und auch bei der Gesangsproduktion adulter Männchen eine Rolle spielt (Nottebohm et al. 1976; McCasland and Konishi 1981; Vu et al. 1994; Ward et al. 1998), an der Niederlegung des arteigenen Gesangsmusters jedoch nicht beteiligt zu sein scheint.

Während das HVC-Volumen adulter gesangsdepriviert aufgezogener Zebrafinkenmännchen in dieser Studie kleiner war als das der sozial aufgezogenen Tiere, war das DLM-Volumen adulter gesangsdepriviert aufgezogener Männchen mehr als doppelt so groß ausgebildet wie das DLM-Volumen sozial aufgezogener Männchen. Da im Entwicklungsverlauf sozial aufgezogener Zebrafinkenmännchen das HVC-Volumen zunimmt (Nixdorf-Bergweiler 1996) und das DLM-Volumen reduziert wird (Johnson and Bottjer 1992), scheint die gesangsdeprivierte Aufzucht eine entwicklungshemmende Wirkung auf die Volumenausbildung dieser beiden Gesangsareale zu haben.

Die Vermutung der Beteiligung des DLM am Gesangslernen und an der Gesangserkennung, aufgrund seiner Einbindung in die AFP (Bottjer et al. 1984; Bottjer et al. 1989; Sohrabji et al. 1990; Scharff and Nottebohm 1991; Doupe and Solis 1997; Margoliash 1997; Scharff et al. 1998; Brainard and Doupe 2000b; Solis and Doupe 2000; Iyengar and Bottjer 2002a), wird gestützt durch die Befunde der vorliegenden Arbeit, wonach die gesangsdeprivierte Aufzucht entwicklungshemmende Folgen auf die Volumenentwicklung des DLM hat.

Direkte Zusammenhänge zwischen Arealvolumen und Verhalten sind bei Weibchen anderer Singvogelarten beobachtet worden. So korreliert das LMAN-Volumen weiblicher Kuhsterlinge (*Molothrus ater*) mit dem Vermögen zur Diskriminierung von arteigenem männlichem Gesang (Hamilton et al. 1997) und bei den Weibchen der Schilfrohrsänger (*Acrocephalus schoenobaenus*) korreliert das LMAN-Volumen mit der Repertoiregröße des Männchengesangs (DeVoogd et al. 1996). Bei Zebrafinken hingegen ist in der hier dargelegten Arbeit kein Zusammenhang zwischen dem LMAN-Volumen von Weibchen und der zur Diskriminierung notwendigen Musterniederlegung des arteigenen Gesangs ermittelt worden. Ergebnissen dieser Studie zufolge unterschied sich das LMAN-Volumen sozial aufgezogener Zebrafinkenweibchen, die das arteigene Gesangsmuster gelernt haben, nicht vom LMAN-Volumen gesangsdepriviert aufgezogener Weibchen. Vermutlich besteht aus diesem Grund bei

Zebrafinken keine Korrelation zwischen der Repertoiregröße des männlichen Gesangs und dem LMAN-Volumen bei Weibchen. Die Tatsache, dass im LMAN bei Männchen und Weibchen, beim Vergleich innerhalb des gleichen Geschlechts, keinerlei Unterschiede zwischen sozial und gesangsdepriviert aufgezogenen Tieren festgestellt worden sind, lässt darauf schließen, dass die hier untersuchten Parameter im LMAN nicht an der Gedächtnisniederlegung des arteigenen Gesangsmusters beteiligt sind.

Der LMAN ist an der Diskriminierung zwischen dem eigenen Gesang und dem Gesang eines anderen Zebrafinkenmännchens beteiligt (Doupe and Solis 1997; Scharff et al. 1998), wie auch bei der Registrierung von Veränderungen im eigenen Gesang, wie zum Beispiel der Veränderung der Gesangsgeschwindigkeit (Williams and Metha 1999). Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stützen diese Befunde, da zwischen gesangsdepriviert und sozial aufgezogenen Männchen im LMAN keine Unterschiede ermittelt wurden, denn der Gesang gesangsdepriviert aufzogener Männchen unterscheidet sich nicht in der Gesangsgeschwindigkeit, sondern durch die Anzahl der Gesangselemente (Eales 1985; Morrison and Nottebohm 1993).

Aufgrund der Beteiligung des RA an der Gesangsproduktion ermöglichen Studien an gesangsdepriviert aufgezogenen Männchen keine klaren Aussagen über die Beteiligung des RA an der Niederlegung eines arteigenen Gesangsmusters, beziehungsweise an der Diskriminierung zwischen artfremdem und arteigenem Gesang, da diese Befunde auch in der veränderten Gesangsproduktion gesangsdepriviert aufzogener Männchen begründet sein könnten. Darum bleibt in der vorliegenden Studie unklar, womit die geringere Neuronendichte im RA adulter gesangsdepriviert aufzogener Männchen zusammenhängt. Da der RA den Ausgang des telencephalen Gesangssystems darstellt (Vicario and Raksin 2000) und bei Zebrafinkenmännchen Informationen sowohl von der AFP als auch von der prämotorischen Bahn erhält, könnte der RA bei Männchen eine wichtige Station der Konvergenz sein, in der ein Abgleich eigener Gesangsproduktion mit dem im Gedächtnis niedergelegten Gesangsmuster stattfindet.

Bei Zebrafinkenweibchen kann der Zusammenhang morphologischer Veränderungen im RA nach gesangsdeprivierter Aufzucht mit veränderter Gesangsproduktion ausgeschlossen werden, da diese lediglich angeborene Kontaktrufe äußern, an deren Produktion der RA nicht beteiligt ist (Simpson and Vicario 1990). Morphologische Veränderungen, die nach gesangsdeprivierter Aufzucht im RA bei Weibchen entstehen,

könnten mit der Speicherung des arteigenen Gesangsmusters in Zusammenhang stehen. Im RA gesangsdepriviert aufgezogener Weibchen waren sowohl das RA-Volumen, als auch die Neuronenanzahl nur nahezu halb so groß wie bei sozial aufgezogenen Weibchen, wobei sich nur im RA-Volumen ein signifikanter Unterschied ergab. Zudem wurden auf zellulärer Ebene morphologische Unterschiede im RA von Weibchen ermittelt. Sowohl die Somata- als auch die Nukleusanschnittsflächen der gesangsdepriviert aufgezogenen Weibchen waren verringert.

Obwohl in den vergleichenden Untersuchungen zwischen den Geschlechtern im RA ein deutlicher Sexualdimorphismus bezüglich der hier untersuchten morphologischen Parameter ermittelt wurde (Abschnitt 4.2.), weisen die deprivationsbedingten Veränderungen bei Zebrafinkenweibchen darauf hin, dass der RA bei der Speicherung des arteigenen Gesangsmusters eine wichtige Rolle spielt. Durch die Beteiligung des RA an der Gesangsproduktion von Zebrafinkenmännchen wurden diese deprivationsbedingten Veränderungen im RA der Männchen wahrscheinlich überdeckt. Dies ist bei Zebrafinkenweibchen nicht der Fall, da sie lediglich angeborene Kontaktrufe äußern, an deren Produktion der RA nicht beteiligt ist (Simpson and Vicario 1990).

4.4. Schlussbetrachtung

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Verbindungen der AFP, die mit der Gedächtnisniederlegung des arteigenen Gesangsmusters in Zusammenhang gebracht wird, bei Männchen und Weibchen ähnlich ausgebildet sind. Auf diesem Befund weiterführende vergleichende Untersuchungen zur Morphologie der Gesangsareale der AFP zwischen sozial aufgezogenen Zebrafinkenmännchen und -weibchen zeigten Übereinstimmungen bezüglich des LMAN-Volumens und des DLM-Volumens sowie bezüglich der neuronalen Dichte im RA. Darüber hinaus konnten nach gesangsdeprivierter Aufzucht Zusammenhänge zwischen Veränderungen auf Verhaltensebene und auf neuronaler Ebene gezeigt werden. Es konnten Hirnareale identifiziert werden, die sich bei Lernvorgängen plastisch verändern. Bei den Männchen wurde durch den Versuchsansatz der gesangsdeprivierten Aufzucht die normale Gesangsentwicklung behindert. Damit einhergehend wurde in den an der Gesangsproduktion beteiligten Gesangsarealen HVC (bezüglich der Volumenausbildung) und im RA (bezüglich der neuronalen Dichte) Veränderungen nachgewiesen. Sowohl bei Männchen als auch bei Weibchen wurde durch die gesangsdeprivierte Aufzucht, die Möglichkeit, den arteigenen Gesang von einem Tutor zu hören und im Gedächtnis als arteigenes Gesangsmuster niederzulegen, unterbunden. Besonders interessant erscheinen demzufolge morphologische Veränderungen nach gesangsdeprivierter Aufzucht in Gesangsarealen, bei denen es darüber hinaus morphologische Übereinstimmungen zwischen sozial aufgezogenen Männchen und Weibchen gibt. Solche Veränderungen wurden bezüglich des DLM-Volumens und der Neuronendichte im RA gesangsdeprivierter Männchen beobachtet. Die bei Weibchen ermittelten morphologischen Unterschiede durch gesangsdeprivierte Aufzucht konzentrierten sich auf den RA, in dem sowohl das Arealvolumen als auch die Größe der Neurone und der Nuklei signifikant kleiner waren (Abbildung 36).

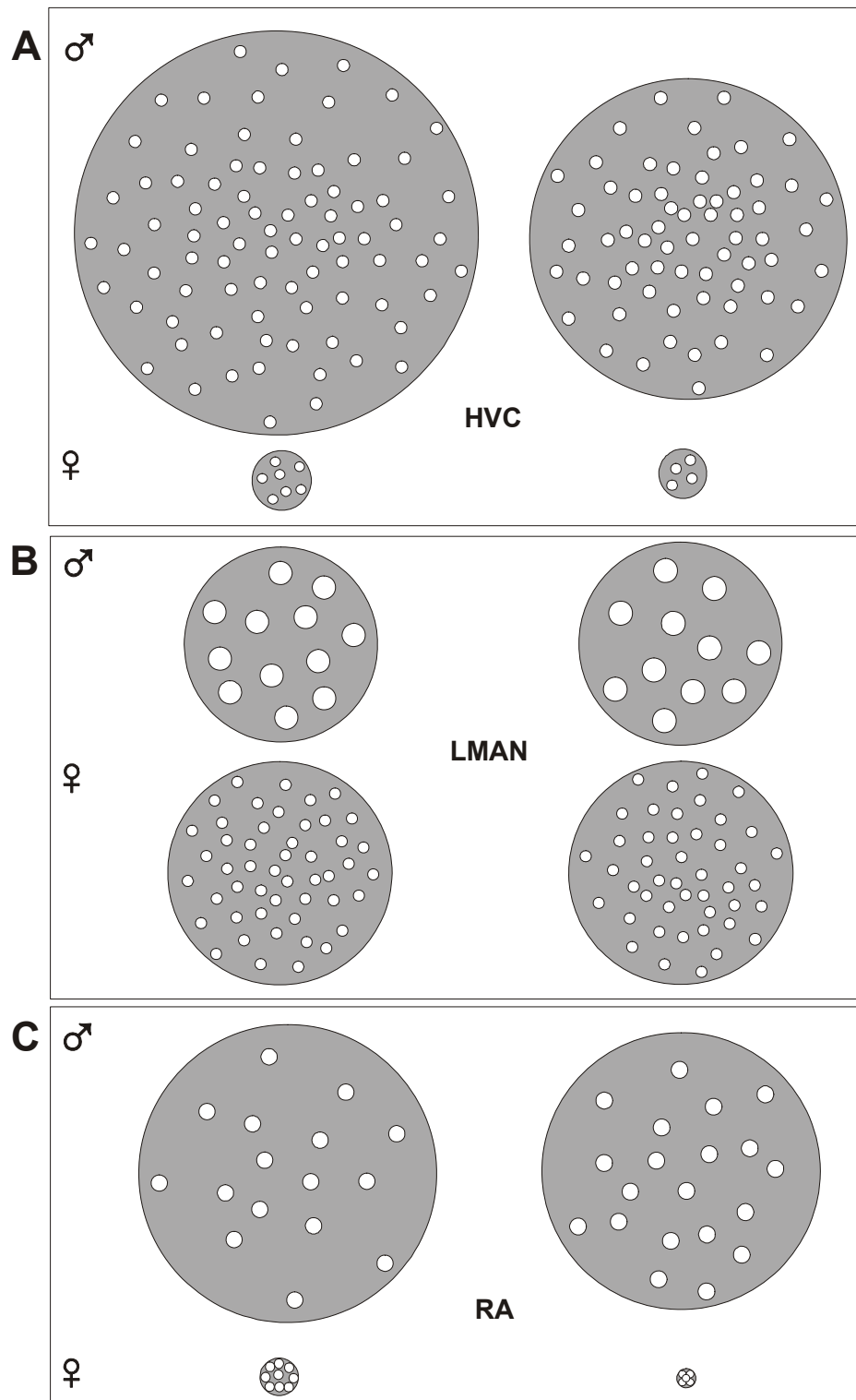


Abb. 36: Schematische Darstellung zur Veranschaulichung der morphologischen Verhältnisse in den Gesangsarealen HVC (A), LMAN (B), RA (C) bei sozial (linke Spalte) und gesangsdepriviert (rechte Spalte) aufgezogenen Zebrafinkenmännchen und -weibchen. In jeder Teilabbildung sind in der oberen Reihe die Ergebnisse, die an Männchen und in der unteren Reihe die an Weibchen erhoben wurden,

dargestellt. Jede graue Fläche ist proportional zum Volumen eines spezifischen Gesangsareals. Die Fläche der weißen Kreise ist proportional der Neuronenanschnittsflächen eines Gesangsareals, und deren Anzahl entspricht der Gesamtneuronenanzahl (ein Kreis entspricht 1000 Neuronen). Die Gesangsareale Area-X und DLM sind in diesem schematischen Vergleich nicht dargestellt, da in diesen Gehirnarealen nicht alle in der Abbildung dargestellten Untersuchungsparameter erhoben wurden, da beispielsweise die Area-X bei Weibchen nicht nachweisbar ist.

Da Zebrafinkenweibchen lediglich angeborene Kontaktrufe äußern, an deren Produktion der RA nicht beteiligt ist (Simpson and Vicario 1990), könnten diese deprivationsbedingten Veränderungen Hinweise auf Ort und Art der Speicherung des arteigenen Gesangsmusters geben.

Vom RA ist weiterhin bekannt, dass die synaptische Plastizität der Neurone im RA in engem Zusammenhang mit dem Gesanglernen der Singvögel während der sensiblen Phase steht (Sakaguchi 1997). Außerdem ist der Prozentsatz von ZENK-immunreaktiven-Zellen im RA während der frühen Gesangsentwicklung niedrig und erhöht sich nur in der Zeit, in der das Gesangsmuster niedergelegt wird (Cole et al. 1989; Wisden et al. 1990; Whitney et al. 2000). Da die ZENK-Expression beispielsweise durch LTP induziert wird (Cole et al. 1989; Wisden et al. 1990), wäre es sinnvoll nachzuprüfen, ob im RA eine LTP auslösbar ist.

Da der RA exzitatorische Eingänge aus dem LMAN bekommt, die NMDA Rezeptoren stimulieren (Sakaguchi 1997), wäre es möglich, dass im RA, bei Weibchen wie auch bei Männchen, eine NMDA-abhängige LTP existiert. Insbesondere vergleichende LTP-Experimente mit sozial und gesangsdepriviert aufgezogenen Weibchen wären interessant, um zu überprüfen, ob sich synaptische Plastizität zwischen den beiden Gruppen unterscheidet.

5. LITERATURVERZEICHNIS

- Abercrombie M (1946) Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anat. Rec.* 94:239-247
- Airey DC, Castillo-Juarez H, Casella G, Pollak EJ, DeVoogd TJ (2000) Variation in the volume of zebra finch song control nuclei is heritable: developmental and evolutionary implications. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 267:2099-104
- Airey DC, DeVoogd TJ (2000) Greater song complexity is associated with augmented song system anatomy in zebra finches. *NeuroReport* 11:2339-2344
- Akutagawa E, Konishi M (1994) Two separate areas of the brain differentially guide the development of a song control nucleus in the zebra finch. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 91:12413-12417
- Alvarez-Buylla A, Kirn JR (1997) Birth, migration, incorporation, and death of vocal control neurons in adult songbirds. *J. Neurobiol.* 33:585-601
- Alvarez-Buylla A, Kirn JR, Nottebohm F (1990a) Birth of projection neurons in adult avian brain may be related to perceptual or motor learning. *Science* 249:1444-6
- Alvarez-Buylla A, Ling CY, Kirn JR (1990b) Cresyl violet: a red fluorescent Nissl stain. *J.Neurosci.Methods* 33:129-133
- Alvarez-Buylla A, Ling C-Y, Nottebohm F (1992) High vocal center growth and its relation to neurogenesis, neuronal replacement and song acquisition in juvenile canaries. *J.Neurobiol.* 23:396-406
- Arnold AP (1975) The effects of castration on song development in zebra finches (*Poephila guttata*). *J. Exp. Zool.* 191:261-278
- Arnold AP (1980a) Effects of androgens on volumes of sexually dimorphic brain regions in the zebra finch. *Brain Res.* 185:441-444
- Arnold AP (1980b) Quantitative analysis of sex differences in hormone accumulation in the zebra finch brain: methodological and theoretical issues. *J.Comp.Neurol.* 189:421-436
- Arnold AP (1980c) Sexual differences in the brain. *Ann. Scientist* 68:165-173
- Arnold AP, Bottjer SW, Brenowitz EA, Nordeen EJ, Nordeen KW (1986) Sexual dimorphisms in the neural vocal control system on song birds: ontogeny and phylogeny. *Brain Behav.Evol.* 28:22-31

- Arnold AP, Nottebohm F, Pfaff DW (1976) Hormone concentrating cells in vocal control and other areas of the brain of the zebra finch (*Poephila guttata*). J.Comp.Neurol. 165:487-511
- Ball GF, Riters LV, Balthazart J (2002) Neuroendocrinology of song behavior and avian brain plasticity: multiple sites of action of sex steroid hormones. Front Neuroendocrinol 23:137-78
- Basham ME, Nordeen EJ, Nordeen KW (1996) Blockade of NMDA receptors in the anterior forebrain impairs sensory acquisition in the zebra finch (*Poephila guttata*). Neurobiol Learn Mem 66:295-304.
- Bischof HJ, Böhner J, Sossinka R (1981) Influence of external stimuli on the quality of the song of the zebra finch (*Taeniopygia guttata castanotis* Gould). Z.Tierpsychol. 57:261-267
- Bischof HJ, Herrmann K (1988) Isolation-dependent enhancement of 2-[(14)C] deoxyglucose uptake in the forebrain of zebra finch males. Behav.Neural.Biol. 49:386-397
- Bock J, Braun K (1999) Filial imprinting in domestic chicks is associated with spine pruning in the associative area, dorsocaudal neostriatum. E J Neuroscience 11:2566-2570.
- Boettiger CA, Doupe AJ (1998) Intrinsic and thalamic excitatory inputs onto songbird LMAN neurons differ in their pharmacological and temporal properties. J Neurophysiol 79:2615-2628
- Boettiger CA, Doupe AJ (2001) Developmentally restricted synaptic plasticity in a songbird nucleus required for song learning. Neuron 31:809- 818
- Böhner J (1981) Untersuchungen zur Selektivität des Gesangserwerbs beim australischen Zebrafinken (*Taeniopygia guttata castanotis*).
- Böhner J (1990) Early acquisition of song in the zebra finch, *Taeniopygia guttata*. Anim.Behav. 39:369-374
- Böhner J (1991) Ontogenetische Entwicklung von Gesangsaktivität und -struktur beim Zebrafinken (*Taeniopygia guttata*). Verh.Dtsch.Zool.Ges. 84:468-469
- Böhner J, Harding CF, Marler P (1992) Androstenedione therapy reinstates normal, not supernormal, song structure in castrated adult male zebra finches. Hormones and Behavior 26:136-142

- Bolhuis JJ, Van Mil DP, Houx BB (1999) Song learning with audiovisual compound stimuli in zebra finches. *Anim Behav* 58:1285-1292
- Bottjer SW (2004) Developmental regulation of basal ganglia circuitry during the sensitive period for vocal learning in songbirds. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1016:395-415
- Bottjer SW, Arnold AP (1984) The role of feedback from the vocal organ. I. Maintenance of stereotypical vocalizations by adult zebra finches. *J. Neurosci.* 4:2387-2396
- Bottjer SW, Brady JD, Cribbs B (2000) Connections of a motor cortical region in zebra finches: relation to pathways for vocal learning. *J Comp Neurol* 420:244-260
- Bottjer SW, Glaessner SL, Arnold AP (1985) Ontogeny of brain nuclei controlling song learning and behavior in zebra finches. *J. Neurosci.* 5:1556-1562
- Bottjer SW, Halsema KA, Brown SA, Miesner EA (1989) Axonal connections of a forebrain nucleus involved with vocal learning in zebra finches. *J. Comp. Neurol.* 279:312-326
- Bottjer SW, Johnson F (1997) Circuits, Hormones, and Learning: vocal Behavior in Songbirds. *J. Neurobiol.* 33:602-618
- Bottjer SW, Miesner EA, Arnold AP (1984) Forebrain lesions disrupt development but not maintenance of song in passerine birds. *Science* 224:901-903
- Bottjer SW, Miesner EA, Arnold AP (1986) Changes in neuronal number, density and size account for increases in volume of song-control nuclei during song development in zebra finches. *Neuroscience Letters* 67:263-268
- Bottjer SW, Sengelaub DR (1989) Cell death during development of a forebrain nucleus involved with vocal learning in zebra finches. *J. Neurobiol.* 20:609-618
- Braaten RF, Reynolds K (1999) Auditory preference for conspecific song in isolation-reared zebra finches. *Animal Behaviour* 58:105-111
- Brainard MS (2004) Contributions of the anterior forebrain pathway to vocal plasticity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1016:377-394
- Brainard MS, Doupe AJ (1997) Anterior forebrain lesions eliminate deafening induced song deterioration in adult zebra finches. *Soc. Neurosci. Abstr.* 23:796
- Brainard MS, Doupe AJ (2000a) Auditory feedback in learning and maintenance of vocal behaviour. *Nature Neurosci. Reviews* 1:31-40
- Brainard MS, Doupe AJ (2000b) Interruption of a basal ganglia-forebrain circuit prevents plasticity of learned vocalizations. *Nature* 404:762-766

- Brown ES, Woolston J, Frol A, Bobadilla L, Khan DA, Hanczyc M, Rush AJ, Fleckenstein J, Babcock E, Cullum CM (2004) Hippocampal volume, spectroscopy, cognition, and mood in patients receiving, corticosteroid therapy. *Biol Psychiatry* 55:538-545
- Burek MJ, Nordeen KW, Nordeen EJ (1991) Neuron loss and addition in developing zebra finch song nuclei are independent of auditory experience during song learning. *J. Neurobiol.* 22:215-223
- Burek MJ, Nordeen KW, Nordeen EJ (1993) Ontogeny of sex differences among HVC projection neurons. *Soc. Neurosci. Abstr.* 19:1312
- Cammermeyer J (1978) Is the solitary dark neuron a manifestation of postmortem trauma to the brain inadequately fixed by perfusion? *J. Histochem.* 56:97-115
- Canady RA, Burd GD, DeVogd TJ, Nottebohm F (1988) Effect of testosterone on input received by an identified neuron type of the canary song system: a Golgi / electron microscopy / degeneration study. *J. Neurosci.* 8:3770-3784
- Changeux JP, Danchin A (1976) Selective stabilization of developing synapses as a mechanism for the specification of neuronal networks. *Nature* 264:705-771
- Clayton DF (1997) Role of gene regulation in song circuit development and song learning. *J. Neurobiol.* 33:549-571
- Clayton NS (1989) The effects of cross-fostering on selective song learning in estrildid finches. *Behaviour* 109:163-175
- Clayton NS (1998) Memory and the hippocampus in food-storing birds: a comparative approach. *Neuropharmacology* 37:441-452
- Coggeshall RE (1992) A consideration of neural counting methods. *Trends Neurosci* 15:9-13
- Coggeshall RE, Lekan HA (1996) Methods for determining numbers of cells and synapses: a case for more uniform standards of review. *The Journal of Comparative Neurology* 364:6-15
- Cole AJ, Saffen DW, Barban JM, Worley PF (1989) Rapid increase of an immediate early gene messenger RNA in hippocampal neurons by synaptic NMDA receptor activation. *Nature* 340:474-476
- Cynx J (1990) Experimental determination of a unit of song production in the zebra finch (*Taeniopygia guttata*). *J.Comp.Psychol.* 104:3-10

- Cynx J, Nottebohm F (1992) Role of gender, season and familiarity in discrimination of conspecific song by zebra finches (*Taeniopygia guttata*). *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 89:1368-1371
- DeVoogd TJ, Cardin JA, Szekeley T, Büki J, Newman SW (1996) Relative volume of LMAN in female wrblers species varies with the number of songs produced by conspecific males. *Soc. Neurosci. Abstr.* 22:1401
- DeVoogd TJ, Krebs JR, Healy SD, Purvis A (1993) Relations between song repertoire size and the volume of brain nuclei related to song: comparative evolutionary analyses amongst oscine birds. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 254:75-82
- DeVoogd TJ, Nottebohm F (1981a) Gonadal hormones induce dendritic growth in the adult avian brain. *Science* 214:202-4
- DeVoogd TJ, Nottebohm F (1981b) Sex differences in dendritic morphology of a song control nucleus in the canary: a quantitative Golgi study. *J comp Neurol* 196:309-316
- Doupe AJ, Brainard MS, Hessler NA (1999) The song system: neural circuits essential throughout life for vocal behavior and plasticity. In: Gazzaniga MS (ed) *The new cognitive neurosciences*, second edition edn, pp 451-467
- Doupe AJ (1997) Song selective and order selective neurons in the songbird anterior forebrain emerge during vocal development. *Biomed Res* 18:17-37
- Doupe AJ, Konishi M (1991) Song-selective auditory circuits in the vocal control system of the zebra finch. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 88:11339-11343
- Doupe AJ, Kuhl PK (1999) Birdsong and human speech common themes and mechanisms. *Annu. Rev. Neurosci.* 22:567-631
- Doupe AJ, Solis MM (1997) Song- and order-selective neurons develop in the songbird anterior forebrain during vocal learning. *J. Neurobiol.* 33:694-709
- Doupe AJ, Solis MM, Kimpo R, Boettiger CA (2004) Cellular, circuit, and synaptic mechanisms in song learning. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1016:495-523
- Doya K, Sejnowski T (1995) A novel reinforcement model of birdsong vocalization learning. In: Tesauro G, Touretzky DS, Leen TK (eds) *Advances in Neural Information Processing Systems*, vol 7. MIT Press, Cambridge, pp 101-108
- Driscoll I, Hamilton DA, Petropoulos H, Yeo RA, Brooks WM, Baumgartner RN, Sutherland RJ (2003) The aging hippocampus: cognitive, biochemical and structural findings. *Cereb Cortex.* 13:1344-51

- Eales LA (1985) Song learning in zebra finches: some effects of song modes availability on what is learnt and when. *Anim.Behav.* 33:1295-1300
- Eales LA (1987) Song learning in female-raised zebra finches: another look at the sensitive phase. *Anim.Behav.* 35:1356-1365
- Eales LA (1989) The influences of visual and vocal interaction on song learning in zebra finches. *Anim. Behav.* 37:507-508
- Ehret G (1996) Auditorische Systeme. In: Dudel J, Menzel R, Schmidt RF (eds) *Neurowissenschaft*. Springer, pp 353-379
- Farries MA (2004) The avian song system in comparative perspective. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1016:61-76
- Farries MA, Perkel DJ (2000) Electrophysiological properties of avian basal ganglia neurons recorded in vitro. *J Neurophysiol* 84:2502-13.
- Fortune ES, Margoliash D (1992) Cytoarchitectonic organization and morphology of cells of the field L complex in male zebra finches (*Taenopygia guttata*). *J.Comp.Neurol.* 325:388-404
- Fortune ES, Margoliash D (1995) Parallel pathways and convergence onto HVC and adjacent neostriatum of adult zebra finches (*Taenopygia guttata*). *J. Comp. Neurol.* 360:413-441
- Foster EF, Bottjer SW (1992) Axonal connections of a forebrain nucleus in male zebra finches. *Soc. Neurosci. Abstr.*:18:528
- Foster EF, Bottjer SW (1993) Lesion of mMAN produce slight disruption in vocal behavior of juvenile male zebra finches. *Soc. Neurosci. Abstr.* 19:1016
- Foster EF, Mehta RP, Bottjer SW (1997) Axonal connections of the medial magnocellular nucleus of the anterior neostriatum in zebra finches. *J. Comp. Neurol.* 382:364-381
- Garamszegi LZ, Eens M (2004) Brain space for a learned task: strong intraspecific evidence for neural correlates of singing behavior in songbirds. *Brain Res Brain Res Rev.* 44:187-93
- Gehr DD, Hofer SB, Marquardt D, Leppelsack H (2000) Functional changes in field L complex during song development of juvenile male zebra finches. *Brain Res Dev Brain Res* 125:153-65
- Grzimek B (1980) Grzimeks Tierleben, Enzyklopädie des Tierreichs, vol Band 9. Deutscher Taschenbuch Verlag GmbH

- Gundersen HJ, Jensen EB, Kieu K, Nielsen J (1999) The efficiency of systematic sampling in stereology-reconsidered. *J. Microsc.* 193:199-211
- Gurney ME (1981) Hormonal control of cell form and number in the zebra finch song system. *J. Neurosci.* 1:658-673
- Gurney ME (1982) Behavioral correlates of sexual differentiation in the zebra finch song system. *Brain Res.* 231:153-172
- Gurney ME, Konishi M (1980) Hormone induced sexual differentiation of brain and behavior in zebra finches. *Science* 208:1380-1382
- Halsema KA, Bottjer SW (1992) Chemical lesions of a thalamic nucleus disrupt song development in male zebra finches. *Soc Neurosci Abstr* 18:529
- Hamilton KS, King AP, Sengelaub DR, West MJ (1997) A brain of her own: a neural correlate of song assessment in female songbird. *Neurobiology of learning and memory* 68:325-332
- Hamilton KS, King AP, Sengelaub DR, West MJ (1998) Visual and song nuclei correlate with courtship skills in brown-headed cowbirds. *Animal Behaviour* 56:973-982
- Hedreen JC (1998a) Lost caps in histological counting methods. *Anat. Rec.* 250:366-372
- Hedreen JC (1998b) What was wrong with the Abercrombie and empirical cell counting methods? *Anat. Rec.* 250:373-380
- Herrmann K, Arnold AP (1991a) The development of afferent projections to the robust archistriatal nucleus in male zebra finches: a quantitative electron microscopic study. *J. Neurosci.* 11:2063-2074
- Herrmann K, Arnold AP (1991b) Lesions of HVc block the developmental masculinizing effects of estradiol in the female zebra finch song system. *J. Neurobiol.* 22:29-39
- Herrmann K, Bischof HJ (1986) Delayed development of song control nuclei in the zebra finch is related to behavioral development. *J. Comp. Neurol.* 245:167-175
- Hessler NA, Doupe AJ (1999) Singing-related neural activity in a dorsal forebrain-basal ganglia circuit of adult zebra finches. *J. Neurosci.* 19:10461-10481
- Hessler NH, Doupe AJ (1997) Singing-related activity in anterior forebrain nuclei of adult zebra finch. *Soc. Neurosci. Abstr.* 23:245
- Houx BB, Ten Cate C (1998) Do contingencies with tutor behaviour influence song learning in zebra finches? *Behaviour* 135:599-614

- Immelmann K (1969) Song development in the zebra finch and other estrildid finches. In: Hinde RA (ed) Bird vocalizations: Their relation to current problems in biology and psychology. Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp 61-74
- Iyengar S, Bottjer SW (2002a) Development of individual axon arbors in a thalamocortical circuit necessary for song learning in zebra finches. *The Journal of Neuroscience* 22:901-911
- Iyengar S, Bottjer SW (2002b) The role of auditory experience in the formation of neuronal circuits underlying vocal learning in zebra finches. *The Journal of Neuroscience* 22:946-958
- Iyengar S, Viswanathan SS, Bottjer SW (1999) Development of topography within song control circuitry of zebra finches during the sensitive period for song learning. *J. Neurosci.* 19:6037-6057
- Jacobs EC, Grisham W, Arnold AP (1995) Lack of a synergistic effect between estradiol and dihydrotestosterone in the masculinization of the zebra finch song system. *J. Neurol.* 27:513-519
- Janata P, Margoliash D (1999) Gradual emergence of song selectivity in sensorimotor structures of the male zebra finch song system. *J Neurosci* 19:5108-18
- Jarvis ED (2004) Learned birdsong and the neurobiology of human language. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1016:749-777
- Jarvis ED, Nottebohm F (1997) Motor-driven gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4097-4102
- Jarvis ED, Scharff C, Grossman MR, Ramos JA, Nottebohm F (1998) For whom the bird sings: context-dependent gene expression. *Neuron* 21:775-788
- Johnson F (1998) Disruption of song learning following IMAN lesions in fledgling male zebra finches. *Congress of Neuroethology*:301
- Johnson F, Bottjer SW (1992) Growth and regression of thalamic efferents in the song-control system of male zebra finches. *J.Comp.Neurol.* 326:442-450
- Johnson F, Bottjer SW (1994) Afferent influences on cell death and birth during development of a cortical nucleus necessary for learned vocal behavior in zebra finches. *Development* 120:13-24

- Johnson F, Jones C, Taylor P, Thompson J, Turner S (2003) Does vocal practice contribute to individual differences in brain space for singing in zebra finches? Soc. Neurosci. Abstr. 33:294.8
- Johnson F, Sablan MM, Bottjer SW (1995) Topographic organization of a forebrain pathway involved with vocal learning in zebra finches. J.Comp.Neurol. 358:260-278
- Johnson F, Sellix M (2000) Reorganisation of an telencephalic motor region during sexual differentiation and vocal learning in zebra finches. Brain Res Dev Brain Res 121:253-63
- Jones AE, Ten Cate C, Slater PJB (1996) Early experience and plasticity of song in adult male zebra finches (*Taeniopygia guttata*). Journal of Comparative Psychology 110:354-369
- Kafitz KW, Herth G, Bartsch U, Güttinger HR, Schachner M (1992) Application of testosterone accelerates oligodendrocyte maturation in brains of zebra finches. NeuroReport 3:315-318
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (2000) Principles of Neuronal Science, 4 edn. Appleton & Lange
- Karnovsky MH (1965) A formaldehyde - glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. J. Cell Biol. 27:137 A
- Karten HJ (1991) Homology and evolutionary origins of the "neocortex". Brain. Behav. Evol. 38:264-272
- Kelley DB, Nottebohm F (1979) Projections of a telencephalic auditory nucleus -field L- in the canary. J. Comp. Neurol. 183:445-470
- Kimpo RR, Doupe AJ (1997) FOS is induced by singing in distinct neuronal populations in a motor network. Neuron 18:315-25
- Kirn JR, DeVoogd TJ (1989) Genesis and death of vocal control neurons during sexual differentiation in the zebra finch. J.Neurosci. 9:3176-3187
- Kreck G, Nixdorf-Bergweiler BE (1999) Evidence for the existence of an anterior forebrain pathway in female zebra finches identified by in vivo and in vitro tracing techniques. Proc. of the 27th Göttingen Neurobiology Conference:280
- Kreck G, Nixdorf-Bergweiler BE (2005) Evidence for a cortical-basal ganglia projection pathway in female zebra finches. Neuroreport 16:21-24

- Konishi M (1965a) Effects of deafening on song development in American robins and black-headed grosbeaks. *Z. Tierpsychol.* 22:584-599
- Konishi M (1965b) The role of auditory feedback in the control of vocalization in the white crowned sparrow. *Z. Tierpsychol.* 22:770-783
- Konishi M (1985) Birdsong: from behavior to neuron. *Ann. Rev. Neurosci.* 125-170
- Konishi M (2004) The role of auditory feedback in birdsong. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1016:463-475
- Konishi M, Akutagawa E (1985) Neuronal growth, atrophy and death in a sexually dimorphic song nucleus in the zebra finch brain. *Nature* 315:145-147
- Konishi M, Akutagawa E (1987) Hormonal control of cell death in a sexually dimorphic song nucleus in the zebra finch. *Ciba.Found.Symp.* 126:173-185
- Korsia S, Bottjer SW (1991) Chronic testosterone treatment impairs vocal learning in male zebra finches during a restricted period of development. *J.Neurosci.* 11:2362-2371
- Kubota M, Saito N (1991) NMDA receptors participate differentially in two different synaptic inputs in neurons of the zebra finch robust nucleus of the archistriatum in vitro. *Neurosci.Lett.* 125:107-109
- Lee DW, Smith GT, Tramontin AD, Soma KK, Brenowitz EA, Clayton NS (2001) Hippocampal volume does not change seasonally in a non food-storing songbird. *Neuroreport* 12:1925-8
- Leonardo A, Konishi M (1999) Decrystallization of adult birdsong by perturbation of auditory feedback. *Nature* 399:466-470
- Li R, Zuo MX, Sakaguchi H (1999) Auditory-vocal cholinergic pathway in zebra finch brain. *Neuroreport* 10:165-9
- Lombardino AJ, Nottebohm F (2000) Age at deafening affects the stability of learned song in adult male zebra finches. *J Neurosci* 20:5054-5064
- Luo M, Ding L, Perkel DJ (1999) Topographic mapping throughout the anterior forebrain pathway of the zebra finch song system. *Soc. Neurosci. Abstr.* 25:1367
- Luo M, Ding L, Perkel DJ (2001) An avian basal ganglia pathway essential for vocal learning forms a closed topographic loop. *The Journal of Neuroscience* 21:6836-6845
- Luo M, Perkel DJ (1999) Long-range GABAergic projection in a circuit essential for vocal learning. *Journal of Comparative Neurology* 403:68-84

- MacDougall-Shackleton SA, Hulse SH, Ball GF (1998a) Neural correlates of singing behavior in male zebra finches (*Taeniopygia guttata*). J Neurobiol 36:412-430
- MacDougall-Shackleton SA, Hulse SH, Ball GF (1998b) Neural bases of song preferences in female zebra finches (*Taeniopygia guttata*). Neuroreport 9:3047-52
- Maekawa M (1997) Song note selective responses of the neurons in a song control nucleus of the zebra finch. Biomed Res 18:39-43
- Margoliash D (1997) Functional organization of forebrain pathways for song production and perception. J. Neurobiol. 33:671-693
- Marler P (1970) A comparative approach to vocal learning: song development in white-crowned sparrows. J Comp Physiol Psychol 71:1-25
- Marler P (1991a) The instinct to learn. In: Gelman SCR (ed) The Epigenesis of Mind: Essays on Biology and Cognition. L. Erlbaum, Hillsdale, New Jersey, pp 37-66
- Marler P (1991b) Song-learning behavior: the interface with neuroethology. TINS 14:199-206
- Marler P (1992) Communication: behavior and neurobiology. seminars in The Neurosciences 4:373-375
- Marler P, Peters S (1987) A sensitive period for song acquisition in the song sparrow: a case of age-limited learning. Ethology 76:89-100
- McCasland JP, Konishi M (1981) Interaction between auditory and motor activities in an avian song-control nucleus. Proc Natl Acad. Sci. US 78:7815-7819
- Mello CV, Clayton DF (1994) Song-induced ZENK gene expression in auditory pathways of song bird brain and its relation to the song control system. J. Neurosci. 14:6652-6666
- Mello CV, Vates GE, Okuhata S, Nottebohm F (1998) Descending auditory pathways in the adult male zebra finch (*Taeniopygia guttata*). J Comp Neurol 395:137-60
- Miller DB (1979) Long-term recognition of father's song by female zebra finches. Nature 280:389-391
- Mooney R (1992) Synaptic basis for developmental plasticity in a birdsong nucleus. J. Neurosci. 12:2464-2477
- Mooney R, Konishi M (1991) Two distinct inputs to an avian song nucleus activate different glutamate receptor subtypes on individual neurons. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4075-4079

- Mooney R, Rao M (1994) Waiting periods versus early innervation: the development of axonal connections in the zebra finch song system. *J.Neurosci.* 14:6532-6543
- Morrison RG, Nottebohm F (1993) Role of a telencephalic nucleus in the delayed song learning of socially isolated zebra finches. *J.Neurobiol.* 24:1045-1064
- Nixdorf BE, Davis SS, DeVoogd TJ (1989) Morphology of Golgi-impregnated neurons in hyperstriatum ventralis, pars caudalis in adult male and female canaries. *J Comp Neurol* 284:337-349.
- Nixdorf-Bergweiler BE, Lips MB, Heinemann U (1995a) Electrophysiological and morphological evidence for a new projection of LMAN-neurons towards area X. *NeuroReport* 6:1729-1732
- Nixdorf-Bergweiler BE, Wallhäusser-Franke E, DeVoogd TJ (1995b) Regressive development in neuronal structure during song learning in birds. *J Neurobiol* 27:204-215.
- Nixdorf-Bergweiler BE (1996) Divergent and parallel development in volume sizes of telencephalic song control regions in male and female zebra finches. *J.Neurobiol.* 375:445-456
- Nixdorf-Bergweiler BE (1997) Nucleolar size and shape is sexually dimorphic in neurons of lateral magnocellular nucleus of the anterior neostriatum (LMAN) in birds. *Cytogenetics and Cell Genetics* 76:77-86.
- Nixdorf-Bergweiler BE (1998) Enlargement of neuronal somata in the LMAN coincides with the onset of sensorimotor learning for song. *Neurobiology of learning and memory* 69:258-273
- Nixdorf-Bergweiler BE, Bindrich A, Freyer C, Hintz V (1999a) Neuronal and behavioral effects of deprivation of memory forming for song are multifaceted. *Soc. Neurosci. Abstr.* 29:752.7
- Nixdorf-Bergweiler BE, Bindrich A, Frommolt KH (1999b) Are introductory notes in zebra finches song genetically determined? *IBAC*
- Nixdorf-Bergweiler BE (2001) Lateral magnocellular nucleus of the anterior neostriatum (LMAN) in the zebra finch: neuronal connectivity and the emergence of sex differences in cell morphology. *Microsc Res Tech* 54:335-53

- Nixdorf-Bergweiler BE, von Bohlen und Halbach V (2004) Major sex differences in the development of myelination are prominent in song system nucleus HVC but not IMAN. *Animal Biology* 54:27-43
- Nixdorf-Bergweiler BE, von Bohlen und Halbach V (2005) Neuronal number in song nucleus LMAN remains high in female zebra finches throughout development and in adulthood. *Acta Zool Sinica* (in press)
- Nordeen EJ, Grace A, Burek MJ, Nordeen KW (1992) Sex-dependent loss of projection neurons involved in avian song learning. *J. Neurobiol.* 23:671-679
- Nordeen EJ, Nordeen KW (1988a) Sex and regional differences in the incorporation of neurons born during song learning in zebra finches. *J. Neurosci.* 8:2869-2874
- Nordeen EJ and Nordeen KW (1989) Estrogen stimulates the incorporation of new neurons into avian song nuclei during adolescence. *Dev. Brain Res.* 49:27-32
- Nordeen EJ, Nordeen KW (1996) Sex difference among nonneuronal cells precedes sexually dimorphic neuron growth and survival in an avian song control nucleus. *Journal of Neurobiology* 30:531-542
- Nordeen EJ, Nordeen KW, Arnold AP (1987a) Sexual differentiation of androgen accumulation within the zebra finch brain through selective cell loss and addition. *J. Comp. Neurol.* 259:393-399
- Nordeen KW, Nordeen EJ, Arnold AP (1986) Estrogen establishes sex differences in androgen accumulation in zebra finch brain. *J. Neuroscience* 6:734-738
- Nordeen KW, Marler P, Nordeen EJ (1989) Addition of song-related neurons in swamp sparrows coincides with memorization, not production, of learned songs. *J. Neurobiol.* 20:651-661
- Nordeen KW, Nordeen EJ (1988b) Projection neurons within a vocal motor pathway are born during song learning in zebra finches. *Nature* 334:149-151
- Nordeen KW, Nordeen EJ (1992) Auditory feedback is necessary for the maintenance of stereotyped song in adult zebra finches. *Behav. Neural Biol.* 57:58-66
- Nordeen KW, Nordeen EJ (1993) Long-term maintenance of song in adult zebra finches is not affected by lesions of a forebrain region involved in song learning. *Behavioral and neural Biology* 57:79-82
- Nordeen KW, Nordeen EJ (1997) Anatomical and synaptic substrates for avian song learning. *J. Neurobiol.* 33:532-548

- Nordeen KW, Nordeen EJ, Arnold AP (1986) Estrogen establishes sex differences in androgen accumulation in zebra finch brain. *J.Neurosci.* 6:734-738
- Nordeen KW, Nordeen EJ, Arnold AP (1987b) Estrogen accumulation in zebra finch song control nuclei: implications for sexual differentiation and adult activation of song behavior. *J.Neurobiol.* 18:569-582
- Nottebohm F (1981) A brain for all seasons: cyclical anatomical changes in song control areas of the songbird brain. *Science* 214:1368-1370
- Nottebohm F (1985) Neuronal replacement in adulthood. In: Nottebohm F (ed) *Hope for a New Neurology*. New York Academy Science, New York, pp 143-161
- Nottebohm F (1987) Birdsong. In: Adelman G (ed) *Encyclopedia of Neuroscience*, vol I. Birkhauser Boston, Boston, pp 133-136
- Nottebohm F (1989) Vom Vogelgesang zur Bildung neuer Nervenzellen. *Spektrum der Wissenschaft* 4:112-117
- Nottebohm F (1993) The search for neural mechanisms that define the sensitive period for song learning in birds. *Netherlands Journal of Zoology* 43:193-234
- Nottebohm F, Arnold AP (1976) Sexual dimorphism in vocal control areas of the songbird brain. *Science* 194:211-213
- Nottebohm F, Kasparian S, Pandazis C (1981) Brain space for a learned task. *Brain Res.* 213:99-109
- Nottebohm F, Kelley DB, Paton JA (1982) Connections of vocal control nuclei in the canary telencephalon. *J. Comp. Neurol.* 207:344-357
- Nottebohm F, Nottebohm ME, Crane L (1986) Developmental and seasonal changes in canary song and their relation to changes in the anatomy of song-control nuclei. *Behav.Neural Biol.* 46:445-471
- Nottebohm F, Stokes TM, Leonard CM (1976) Central control of song in the canary *Serinus canarius*. *J. Comp. Neurol.* 165:457-486
- Okuhata S, Saito N (1987) Synaptic connections of thalamo-cerebral vocal nuclei of the canary. *Brain Res. Bull.* 18:35-44
- Paton JA, Manogue KR, Nottebohm F (1981) Bilateral organization of the vocal control pathway in the budgerigar. *J. Neuroscience* 11:1279-1288
- Perkel DJ, Farries MA (2000) Complementary "bottom-up" and "top-down" approaches to basal ganglia function. *Current Opinion Neurobiology* 10:725-731

- Pohl-Apel G, Sossinka R (1984) Hormonal determination of song capacity in females of the zebra finch: critical phase of treatment. *Z. Tierpsychol.* 64:330-336
- Price PH (1979) Developmental determinations of structure in zebra finch song. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 93:260-277
- Rehkämper G, Zilles K (1991) Parallel evolution in mammalian and avian brains: Comparative cytoarchitectonic and cytochemical analysis. *Cell Tissue Res.* 263:3-28
- Reiner A, Laverghetta AV, Meade CA, Cuthbertson SL, Bottjer SW (2004) An immunohistochemical and pathway tracing study of the striatopallidal organization of area X in the male zebra finch. *J. Comparative Neurology* 469:239-261
- Reiner A, Perkel DJ, Bruce LL, Butler AB, Csillag A, Kuenzel W, Medina L, Paxinos G, Shimizu T, Striedter G, Wild M (2004) Revised nomenclature for avian telencephalon and some related brainstem nuclei. *J. Comp. Neurol.* 473:377-414
- Riebel K (2003) Developmental influences on auditory perception in female zebra finches - is there a sensitive phase for song preference learning? *Animal. Biol.* 53:73-87
- Riebel K, Smallegange IM, Terpstra NJ, Bolhuis JJ (2002) Sexual equality in zebra finch song preference: evidence for a dissociation between song recognition and production learning. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 269:729-33.
- Rollenhagen A, Bischof HJ (1991) Rearing conditions affect neuron morphology in a telencephalic area of the zebra finch. *Neuroreport* 2:711-4
- Rosen MJ, Mooney R (2000) Intrinsic and extrinsic contributions to auditory selectivity in a song nucleus critical for vocal plasticity. *J Neurosci* 20:5437-5448
- Ryan SM, Arnold AP (1981) Evidence for cholinergic participation in the control of bird song; acetylcholinesterase distribution and muscarinic receptor autoradiography in the zebra finch brain. *J. Comp. Neurol.* 202:211-219
- Saini KD, Leppelsack HJ (1981) Cell types of the auditory caudomedial neostriatum of the starling (*Sturnus vulgaris*). *J. Comp. Neurol.* 198:209-229
- Saito N, Maekawa M (1993) Birdsong: The interface with human language. *Brain Dev.* 15:31-40
- Sakaguchi H (1997) Molecular Mechanisms of Plasticity in the Avian Brain. *Biomed Res* 18:71-78

- Sakaguchi H, Yamaguchi A (1997) Early song-deprivation affects the expression of protein kinase C in the song control nuclei of the zebra finch during a sensitive period of song learning. *Neuroreport* 8:2645-50
- Scharff C, Nottebohm F (1991) A comparative study of the behavioral deficits following lesions of various parts of the zebra finch song system: implications for vocal learning. *J. Neurosci.* 11:2896-2913
- Scharff C, Nottebohm F, Cynx J (1998) Conspecific and heterospecific song discrimination in male zebra finches with lesions in the anterior forebrain pathway. *J Neurobiol* 36:81-90
- Scharff C, Kirn JR, Grossman M, Macklis JD, Nottebohm F (2000) Targeted neuronal death affects neuronal replacement and vocal behavior in adult songbirds. *Neuron* 25:481-492
- Schmidt MF (1996) Neural responses to auditory feedback during singing in Field L of adult zebra finches. *Soc. Neurosci. Abstr.* 22
- Sellix MT, Johnson F (1999) Reorganization of a motor cortical region during song learning in the zebra finch. *Society for Neuroscience* 25:1367
- Shepherd GM (1994) *Neurobiology*. Oxford University Press, New York - Oxford
- Simpson HB, Vicario DS (1990) Brain pathways for learned and unlearned vocalizations differ in zebra finches. *J. Neurosci.* 10:1541-1556
- Simpson HB, Vicario DS (1991a) Early estrogen treatment alone causes female zebra finches to produce learned, male-like vocalizations. *J. Neurobiol.* 22:755-776
- Simpson HB, Vicario DS (1991b) Early estrogen treatment of female zebra finches masculinizes the brain pathway for learned vocalizations. *J. Neurobiol.* 22:777-793
- Slater PJB (1974) Bouts and gaps in the behaviour of zebra finches, with special reference to preening. *Rev. Comp. Animal.* 8:47-61
- Slater PJB, Eales LA, Clayton NS (1988) Song learning in zebra finches (*Taeniopygia guttata*): progress and prospects. Department of Biology and preclinical medicine University of St. Andrews 0:0
- Slater PJB, Jones A, Ten Cate C (1993) Can lack of experience delay the end of the sensitive phase for song learning? *Netherlands Journal of Zoology* 43: 80-90

- Sohrabji F, Nordeen EJ, Nordeen KW (1990) Selective impairment of song learning following lesions of a forebrain nucleus in the juvenile zebra finch. *Behav. Neural Biol.* 53:51-63
- Sohrabji F, Nordeen KW, Nordeen EJ (1989) Projections of androgen-accumulating neurons in a nucleus controlling avian song. *Brain Res.* 448:253-259
- Solis MM, Doupe AJ (2000) Compromised neural selectivity for song in birds with impaired sensorimotor learning. *Neuron* 25:109-121
- Sossinka R, Böhner J (1980) Song types in the zebra finch *Poephila guttata castanotis*. *Z. Tierpsychol.* 53:123-132
- Spiro JE, Dalva MB, Mooney R (1999) Long-range inhibition within the zebra finch song nucleus RA can coordinate the firing of multiple projection neurons. *J Neurophysiol* 81:3007-20
- Starkman MN, Giordani B, Gebarski SS, Schteingart DE (2003) Improvement in learning associated with increase in hippocampal formation volume. *Biol Psychiatry* 53:233-238
- Sterio DC (1984) The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J Microscopy* 134:127-136
- Stocker S, Güttinger HR, Herth G (1994) Exogenous testosterone differentially affects myelination and neurone soma sizes in the brain of canaries. *NeuroReport* 5:1449-1452
- Thorpe WH (1958) The learning of song in birds, with special reference to the song of the chaffinch *Fringilla coelebs*. *Zool. Jb. Syst.* 100:535-570
- Thorpe WH (1961) *Bird Song*. Cambridge University Press, Cambridge
- Tramontin AD, Smith GT, Breuner CW, Brenowitz EA (1998) Seasonal plasticity and sexual dimorphism in the avian song control system: Stereological measurement of neuron density and number. *J Comp Neurol* 396:186-192
- Tramontin AD, Hartman VN, Brenowitz EA (1999) Rapid and sequential growth of adult avian song nuclei in response to seasonal cues. *Soc. Neurosci. Abstr.* 25:864
- van der Knaap MS, Valk J, Bakker CJ, Schooneveld M, Faber JA, Willemse J, Gooskens RH (1991) Myelination as an expression of the functional maturity of the brain. *Dev-Med-Child-Neurol.* 33:849-57

- Vates GE, Broome BM, Mello CV, Nottebohm F (1996) Auditory pathways of caudal telencephalon and their relation to the song system of adult male zebra finches (*Taeniopygia guttata*). J.Comp.Neurol. 366:613-642
- Vates GE, Nottebohm F (1995) Feedback circuitry within a song-learning pathway. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 92:5139-5143
- Vates GE, Vicario DS, Nottebohm F (1997) Reafferent thalamo- "cortical" loops in the song system of oscine songbirds. The Journal of Comparative Neurology 380:275-290
- Vicario DS (1991) Organization of the zebra finch song control system: II. Functional organization of outputs from nucleus Robustus archistriatalis. J.Comp.Neurol. 309:486-494
- Vicario DS (1993) A new brain stem pathway for vocal control in the zebra finch song system. Neuroreport. 4:983-986
- Vicario DS (1994) Motor mechanisms relevant to auditory-vocal interactions in songbirds. Brain Behav Evol 44:265-278
- Vicario DS, Nottebohm F (1988) Organization of the zebra finch song control system: I. Representation of syringeal muscles in the hypoglossal nucleus. J.Comp.Neurol. 271:346-354
- Vicario DS, Raksin JN (2000) Possible roles for GABAergic inhibition in the vocal control system of the zebra finch. Neuroreport 11:3631-5.
- Volman SF, Khanna H (1995) Convergence of untutored song in group-reared zebra finches (*Taeniopygia guttata*). J.Comp.Psychol. 109:211-221
- von Bartheld CS (2002) Counting particles in tissue sections: choices of methods and importance of calibration to minimize biases. Histol. Histopathol. 17:639-648
- Vu ET, Mazurek MW, Kuo YC (1994) Identification of a forebrain motor programming network for the learned song of zebra finches. J.Neurosci. 14:6924-6934
- Wallhäusser E, Scheich H (1987) Auditory imprinting leads to differential 2-deoxyglucose uptake and dendritic spine loss in the chick rostral forebrain. Brain Res 428:29-44.
- Wallhäusser-Franke E, Nixdorf Bergweiler BE, DeVoogd TJ (1995) Song isolation is associated with maintaining high spine frequencies on zebra finch LMAN neurons. Neurobiol.Learn.Mem. 64:25-35

- Wang J, Sakaguchi H, Sokabe M (1999) Sex differences in the vocal motor pathway of the zebra finch revealed by real-time optical imaging technique. *NeuroReport* 10:2487-2491
- Ward BC, Nordeen EJ, Nordeen KW (1998) Individual variation in neuron number predicts differences in the propensity for avian vocal imitation. *Proc Nat Acad Sci USA* 95:1277-1282
- West MJ (1993) New stereological methods for counting neurons. *Neurobiol. Aging* 14:275-285
- West MJ (1999) Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: issues of precision and bias. *TINS* 22:51-61
- West MJ, Slomanka L (2001) 2-D versus 3-D cell counting - a debate. What is an optical disector? *TINS* 24:374-380
- Whitney O, Johnson F (2003) Singing - driven zenk expression: regulation by auditory feedback during zebra finch vocal learning. *Soc. Neurosci. Abstr.* 33:522.6
- Whitney O, Soderstrom K, Johnson F (2000) Post-transcriptional regulation of zenk expression associated with zebra finch vocal development. *Brain Res Mol Brain Res* 80:279-90.
- Wild JM (1993a) Descending projections of the songbird nucleus robustus archistriatalis. *The Journal of Comparative Neurology* 338:225-241
- Wild JM (1993b) The avian nucleus retroambigualis: a nucleus for breathing, singing and calling. *Brain Research* 606:319-324
- Wild JM (1994) The auditory-vocal-respiratory axis in birds. *Brain Behav. Evol.* 44:192-209
- Wild JM (1997) Neural pathways for the control of birdsong production. *J. Neurobiol.* 33:653-670
- Williams H (1985) Sexual dimorphism of auditory activity in the zebra finch song system. *Behav. Neural Biol.* 44:470-484
- Williams H (1989) Multiple representations and auditory-motor interactions in the avian song system. *Ann NY Acad Sci* 563:148-164
- Williams H, Cynx J, Nottebohm F (1989) Timbre control in zebra finch (*Taeniopygia guttata*) song syllables. *J. Comp. Psychol.* 103:366-380
- Williams H, Metha N (1999) Changes in adult zebra finch song require a forebrain nucleus that is not necessary for song production. *J Neurobiol* 39:14-28

- Williams H, Staples K (1992) Syllable chunking in zebra finch (*Taeniopygia guttata*) song. J.Comp.Psychol. 106:278-286
- Wisden W, Errington ML, Williams S, Dunnett SB, Waters C, Hitchcock D, Evan G, Bliss TV, Hunt SP (1990) Differential expression of immediate early genes in the hippocampus and spinal cord. Neuron 4:603-614
- Zann R (1984) Structural variation in the zebra finch distance call. Z. Tierpsychol. 66:328-345
- Zann R (1985) Ontogeny of the zebra finch distance call: I) Effects of cross-fostering to bengalese finches. Z. Tierpsychol 68:1,23
- Zann R (1996) The Zebra Finch. Oxford University Press

6. ANHANG

6.1. Rezepturen

Bleizitrat

1g Bleizitrat ($\text{Pb}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7) \times 3 \text{ H}_2\text{O}$) wird in 50 ml Aqua dest. gelöst, wobei eine milchige Lösung entsteht. Dieser 2 %igen Bleizitratlösung wird tropfenweise 10 N NaOH-Lösung zugesetzt, bis die Lösung aufklart.

EPON-Gemisch (Kunstharz)

Benötigte Substanzen:

Epon812 (Epichlorohydrin; Epoxyharz)

MNA (Methylnadic-anhydrid; Härter)

DDSA (Dodecenylnbernsteinsäureanhydrid; Härter)

DMP-30 (2,4,6-Tris-(dimethylaminomethyl)-phenol; Beschleuniger)

17,28 g Epon, 7,92 g MNA und 3,96 g DDSA werden zusammen in einen Plastikbecher gegeben und mit einem Magnetrührer gemischt. Direkt vor Beginn der Einbettung werden 0,6 g DMP-30 hinzugefügt und unter Erhitzen wird das Gemisch gerührt bis alles gelöst ist.

Equithesin

Zur Herstellung von Equithesin werden zunächst 1,15 g Pentobarbital in 12 ml Ethanol (96 %ig) gelöst. Dann werden 54 ml Propandiol zugegeben, wodurch eine milchige Lösung entsteht (--> Lösung A). Des Weiteren werden 2,5 g Magnesiumsulfat in 50 ml Aqua dest. gelöst (--> Lösung B). Lösung A und B werden nun vermischt, und darin werden 5 g Chloralhydrat gelöst. Die Lösung wird nun durch einen Sterilisationsfilter filtriert und in Portionen zu 20 ml bei 4 ° C gelagert.

Die Dosierung zur Betäubung des Versuchstieres beträgt 0,0042 ml Equithesin pro 1 g Körpergewicht.

Farbstoffaliquots

250 mg Rhodamin-Dextran-Amin (RDA) werden in 1 ml Aqua dest. gelöst. Die Lösung wird in Aliquots zu je 10 µl aufgeteilt. Diese Aliquots werden jeweils mit 10 µl Mineralöl überschichtet, um Sublimieren des Aqua dest. zu verhindern. Zum Aufbewahren werden sie bei –18 °C tiefgefroren.

Gelatine beschichtete Objektträger

2,5 g Gelatine werden in 500 ml Aqua dest. unter Erwärmen auf 60° C gelöst. Danach werden 0,25 g Chromalaun (Kalium-Chrom-III-Sulfat; Chromium potassiumsulfate) zugesetzt. Die abgekühlte Gelatinelösung wird filtriert. Die gereinigten Objektträger werden einseitig mit der Gelatinelösung bestrichen. Die bestrichenen Objektträger werden etwa 30 Minuten im Wärmeschrank bei 40° C getrocknet und ein zweites Mal mit Gelatine bestrichen und getrocknet.

Glutardialdehyd / Paraformaldehyd-Fixativ

9 g Paraformaldehyd werden mit 114 ml Aqua dest. unter ständigem Rühren auf 65 °C erhitzt und gelöst (evtl. ein paar Tropfen 1 N NaOH zufügen, damit die Lösung aufklart). Die auf Raumtemperatur abgekühlte Lösung wird filtriert, dann werden 150 ml 0,2 M Natriumcacodylatpuffer hinzugegeben. Die Lösung wird bei 4 °C aufbewahrt. Kurz vor der Perfusion werden 36 ml einer 30 %igen Glutaraldehydlösung hinzugefügt. Zur besseren Membrankonservierung wird der Fixierlösung noch CaCl₂ zugesetzt (Karnovsky 1965). Hierfür werden 2,94 g CaCl₂ in 100 ml Aqua dest. gelöst, davon wird 1 ml der Fixierlösung zugefügt.

Methylenblau-Toluidinblau-Färbelösung

1 Spatelspitze Methylenblau und 1 Spatelspitze Toluidinblau werden in 0,1 M Natriumcacodylatpuffer unter Rühren gelöst. Danach wird die Lösung abfiltriert.

Natriumcacodylatpuffer

Für 0,2 M Natriumcacodylatpuffer werden 4,28 g Dimethylarsensäure-Natriumsalz-Trihydrat (C₂H₆AsNaO₂ x 3H₂O) in 100 ml Aqua dest. gelöst.

Für 0,1 M Natriumcacodylatpuffer wird die 0,2 M Lösung 1:1 mit Aqua dest. verdünnt.

Nissl-Färbung

Zunächst wird Acetatpuffer hergestellt. Hierfür werden 16,4 g / l Natriumacetat in Aqua dest. angesetzt und mit 99 %iger Essigsäure auf einen pH-Wert von 6,0 eingestellt. Für die Färbelösung wird 1 g Kresylviolett in 200 ml Natriumacetatpuffer (pH 3,8 – 4,0) gelöst.

Die Schnitte werden in einer absteigenden Alkoholreihe aus 96 % Ethanol, 70 % Ethanol für je zwei Minuten inkubiert, dann kurz in Aqua dest. gewässert und dann für fünf bis zehn Minuten in der 0,5 %igen Kresylviolett-Acetate-Lösung gefärbt.

Zum Ausdifferenzieren der Färbung werden die Schnitte in Acetatpuffer (pH 6,0) gespült und in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert: 70 % Ethanol, 90 % Ethanol, 96 % Ethanol (jeweils ca. fünf Minuten) und reinem Isopropanol (nur kurz eintauchen). Anschließend werden die Schnitte zweimal für ein bis fünf Minuten in Xylol inkubiert und dann mit Merckoglas eingedeckelt.

Osmiumtetroxidlösung (1 %ig)

Es werden 2 ml einer wässrigen 4 %igen Osmiumtetroxidlösung (OsO_4) mit 2 ml 0,2 M Natriumcacodylatpuffer verdünnt. Diese Lösung wird mit 0,1 M Natriumcacodylatpuffer auf 8 ml aufgefüllt.

4 % Paraformaldehyd in Phosphatpuffer

12 g Paraformaldehyd (PFA) werden in 300 ml 0,1 M Phosphatpuffer (PB) bei 60 – 70 °C gelöst. Wenn die Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt ist, wird sie filtriert.

Phosphatpuffer (0,1 M; pH 7,4)

14,25 g ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) und 2,6 g ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) werden in 950 ml Aqua dest. gelöst. Der pH-Wert wird mit NaOH auf 7,4 eingestellt. Danach wird mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt.

Physiologische Kochsalzlösung (0,9 %)

9,0 g NaCl werden in 900 ml Aqua dest. gelöst. Der pH-Wert wird mit NaOH auf 7,4 eingestellt. Danach wird die Lösung mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt.

Saccharose-Lösungen

Zur Herstellung der 15 %igen Saccharoselösung werden 15 g Saccharose in 100 ml Paraformaldehyd (4 %ig in PB) gelöst. Für die 30 %ige Saccharoselösung werden dementsprechend 30 g Saccharose in 100 ml Paraformaldehyd (4 %ig in PB) gelöst.

Uranylacetat

1g Uranylacetat wird in 50 ml Methanol (70 %ig) gelöst. Die Lösung wird lichtgeschützt im Abzug aufbewahrt (falls die Lösung trübe geworden ist, muss sie verworfen werden). Vor Gebrauch wird jeweils eine kleine Menge abfiltriert.

6.2. Veröffentlichungsnachweis

Hintz, V. and B. E. Nixdorf-Bergweiler (1997); Myelination in the lateral magnocellular nucleus of the anterior neostriatum (LMAN) and the high vocal center (HVC) during development in male and female zebra finches. *In N. Elsner and H. Wässle (Eds.), Neurobiology: From Membrane to Mind, Proc. of the 25th Göttingen Neurobiology Conference (Vol II), Georg Thieme Verlag, Stuttgart; p.344.*

Hintz, V. and B. E. Nixdorf-Bergweiler (1998); Neuronal density in the lateral magnocellular nucleus of the anterior neostriatum is enhanced in tutor-deprived zebra finches. *In N. Elsner and R. Wehner (Eds.), New Neuroethology on the Move, Proc. of the 26th Göttingen Neurobiology Conference (Vol I), Georg Thieme Verlag, Stuttgart: p.160.*

Nixdorf-Bergweiler, B. E., Bindrich, A., Freyer, C., **Hintz, V.** and Kreck, G. (1998); Neuronal correlates of learning in the song system of the zebra finch. *In: European Journal of Neuroscience, Suppl. 10, Vol. 10, 56.38.*

Hintz, V. and Nixdorf-Bergweiler, B.E. (1999); Does the anterior forebrain loop play a role for song memorization in female zebra finches? *In N. Elsner and U. Eysel (Eds.), From Molecular Neurobiology to Clinical Neuroscience Proc. of the 27th Göttingen Neurobiology Conference (Vol II), Georg Thieme Verlag, Stuttgart: p.279.*

Hintz, V. and Nixdorf-Bergweiler, B.E. (1999); Sensory deprivation of memory formation for song learning induces multiple effects onto neuronal structure. *In: Berlin Neuroscience Forum Congress Center Bogensee p.141.*

Nixdorf-Bergweiler, B.E., Bindrich, A., Freyer, C., **Hintz, V.** (1999); Neuronal and behavioral effects of deprivation of memory formation for song are multifaceted *Soc. Neurosci. Abstr., Vol. 29, p. 752.7.*

Hintz, V., Kreck, G., Nixdorf-Bergweiler, B.E. (1999); Deprivation of memory formation for song in female birds severely affects neuronal structure in song system nuclei *Soc. Neurosci. Abstr., Vol. 29, p. 752.6.*

Nixdorf-Bergweiler, B. E., **Hintz, V.**, Kreck, G., Schütze, H., Schneeweiss, U. (2000); Investigation of postsynaptic density in LMAN in social and song deprived zebra finches. *Soc. Neurosci. Abstr.*, Vol. 30, p. 564.13.

Nixdorf-Bergweiler, B. E. and **von Bohlen und Halbach, V.** (2004); Major sex differences in the development of myelination are prominent in song system nucleus HVC but not LMAN. *Animal Biology*, Vol. 54, p. 27-43.

Nixdorf-Bergweiler, B. E. and **von Bohlen und Halbach, V.** (2005); Neuronal number in song nucleus LMAN remains high in female zebra finches throughout development and in adulthood. *Acta Zool Sinica*. (in press).

6.3. Erklärung

Ich versichere, dass die hier vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unzulässige Hilfe angefertigt wurde. Benutzte Quellen und Hilfsmittel sind vollständig angegeben, und die Stellen der Arbeit, die anderen Publikationen im Wortlaut oder dem Sinne nach entnommen sind, sind in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht.

Ich versichere, dass die Dissertation noch keiner anderen Fakultät vorgelegen hat und dass sie noch nicht veröffentlicht wurde.

Ich bin in Kenntnis gesetzt worden über die dem angestrebten Verfahren zugrunde liegende Promotionsordnung.